

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年12月14日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75655 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/50,
33/15, A61K 45/00, A61P 27/04, 37/06, C12N 15/12,
C12Q 1/02, A01K 67/027

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03558

(22) 国際出願日: 2000年6月1日 (01.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/157111 1999年6月3日 (03.06.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菊谷 仁 (KIKU-
TANI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒565-0842 大阪府吹田市千里

山東2丁目17番B-504号 Osaka (JP). 熊ノ郷淳 (KU-
MANOGOH, Atsushi) [JP/JP]; 〒563-0029 大阪府池
田市五月丘1丁目8番3-2-604号 Osaka (JP). 堀 晃
(HORI, Akira) [JP/JP]; 〒662-0965 兵庫県西宮市郷免
町1番25号 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi
et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁
目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka
(JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU,
SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: SCREENING METHOD WITH THE USE OF CD100

(54) 発明の名称: CD100を用いるスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a compound or its salt capable of changing the avidity of CD100 or its salt to CD72 or its salt characterized by using CD100 or its salt and CD72 or its salt. This method is useful as a method of screening a CD72 agonist which is usable as a preventive, a remedy, etc. for viral infection or diseases, bacterial or fungal infection or diseases, cancer and the like, or a CD72 antagonist which is usable as a preventive, a remedy, etc. for diseases caused by abnormal antibody production or excessive antibody production and the like.

(57) 要約:

本発明はCD100またはその塩およびCD72またはその塩を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法を提供する。

本発明はウイルスによる感染症または疾病、細菌または真菌による感染症または疾病、癌などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アゴニスト、または異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。



WO 00/75655 A1



添付公開 類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

CD100を用いるスクリーニング方法

5 技術分野

本発明は、CD100（プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc Natl Acad Sci USA) 93巻、(1996年)11780-11785頁など）またはその塩とその受容体、CD72（ジャーナルオブイミュノロジー（J. Immunol） 149巻（1992年）880-886頁など）を用いることを特徴とする抗体産生誘導剤または抗体異常産生に起因する疾患の予防・治療剤として有用な化合物またはその塩のスクリーニング方法に関する。

背景技術

15 B細胞はIgM、IgD、IgG、IgA、IgEの5つの種類の抗体のいずれか1種類を出しうる。B細胞は分化に伴い、生体内で始めて出会う抗原に遭遇するとまず遺伝子の構成上、まずIgMを産生する。しかし、IgMの生理機能は他の種類の抗体に比べて弱い。同じ抗原の刺激が続くと、遺伝子に変化してIgM以外の種類の抗体が産生され強い生理機能を発揮する。この免疫グロブリンがIgMから他の種類に変わる作用、現象をクラススイッチという。

20 CD40はB細胞上に発現している膜糖蛋白質であり、例えば活性化したT細胞上に発現しているCD40Lと反応する。CD40がないマウスでは、抗体産生、クラススイッチ、ワクチン作用が認められないことが知られており、CD40はB細胞の抗体産生機能にとって必須の分子である。CD40でB細胞を刺激した場合、抗IgM抗体によるB細胞の死滅を抑制し、また、CD40でB細胞を刺激した場合、IgMを含む様々なクラスの抗体産生が誘導される。しかしながら、未だ何がこれらのB細胞の反応を誘導しているのかは不明である。

もし、B細胞の死滅、およびクラススイッチを制御することができれば、B細胞の抗体産生を調節することが可能になる。

抗体産生がすみやかに産生されることが要求される場合、例えばかぜ症候群、

5

発明の開示

10

25

すなわち、本発明は、

(1) CD 100またはその塩およびCD 72またはその塩を用いることを特徴

および自己抗体量の増加について示す。

図9は実施例10中のCD100ノックアウトマウスにおける樹状細胞の反応性の喪失について示す。

図10は実施例11中のCD100トランスジェニックマウスにおけるT細胞の反応性亢進について示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明におけるCD100に関して、具体的には、公知のCD100またはその塩〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc Natl Acad Sci USA) 93巻、(1996年)11780-11785頁; ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 271巻、(1996年)33376-33381頁〕などがあげられるのみならず、

(17) 配列番号: 1または配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド(以下、CD100と略称する) またはその塩、または

(18) ポリペプチドが、配列番号: 1または配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号: 1または配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加した(または挿入された)アミノ酸配列、あるいは配列番号: 1または配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(17)項記載のCD100またはその塩などがあげられる。

また、本発明におけるCD72に関して、具体的には、公知のCD72またはその塩〔ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、144巻、4870-4877頁(1990); ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、149巻、880-886頁(1992)〕などがあげられる。マウスCD72についてはザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、149巻、880-886頁(1992)に記載され

ているLyb-2^{a.1}, Lyb-2^{a.2}, Lyb-2^b, Lyb-2^cなどのアロタイプも含まれる。さらにCD 7 2に関して、

(19) 配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド（以下、CD 7 2と略称する）またはその塩、または

(20) ポリペプチドが、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列に1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、あるいは配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(19)項記載のCD 7 2またはその塩などがあげられる。

本明細書において、「実質的に同一」とはポリペプチドなどの活性、例えば、リガンド（CD 1 0 0）と受容体（CD 7 2）の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はしばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチド（いわゆるCD 1 0 0改変体、CD 7 2改変体など）は、そうした置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

本発明で用いられるCD 1 0 0およびCD 7 2の製造法を以下にさらに詳細に

または該DNAを有するその子孫、

(14) 外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物または該DNAを有するその子孫を用いることを特徴とするCD100の亢進に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング法、

(15) 外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物または該DNAを有するその子孫を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法、

(16) 受容体がCD72またはその塩である上記(15)項記載のスクリーニング法などを提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は実施例1中、CD72発現CHO細胞とmCD100-Fcとの結合性を示す。

図2は実施例2中CD100のIgG1特異的抗体産生促進活性を示す。

図3は実施例3中の生体内におけるCD100の抗体産生誘導促進活性について示す。

図4は実施例4中のCD100ノックアウトマウス作製のために用いたターゲティングベクター、野性型マウスおよびノックアウトマウスで予想されるCD100遺伝子の遺伝子地図、野性型マウスおよびノックアウトマウスにおけるCD100遺伝子構造ならびに野性型マウスおよびノックアウトマウスにおけるCD100蛋白質の発現量について示す。

図5は実施例5中の野性型マウスおよびCD100ノックアウトマウスにおけるCD5発現量について示す。

図6は実施例6中のTD(T細胞依存性)抗原に対する抗体産生について示す。

図7は実施例7中のCD100ノックアウトマウスにおけるT細胞の反応性の喪失について示す。

図8は実施例9中のMRL/lprマウスにおける加齢に伴う可溶性CD100

とする、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング法、

(2) CD100またはその塩およびCD72またはその塩を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(3) 上記(1)項記載のスクリーニング法または上記(2)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

(4) CD100またはその塩の活性を促進または阻害する上記(3)項記載の化合物またはその塩、

(5) 上記(3)項記載の化合物またはその塩を含有する医薬、

(6) 抗体産生誘導剤、または抗体異常産生に起因する疾患の予防・治療剤である上記(5)項記載の医薬、

(7) 抗体異常産生に起因する疾患がアレルギーまたは自己免疫疾患である上記(6)項記載の医薬、

(8) CD100またはその塩、あるいはCD100またはその塩および試験化合物をCD72の発現細胞に添加し、発現細胞より産生もしくは分泌された抗体量の変化を測定することを特徴とする上記(1)項記載のスクリーニング法、

(9) T細胞の反応性が喪失した、CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物、

(10) CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いることを特徴とするCD100の欠損に起因する疾患の予防・治療薬のスクリーニング法、

(11) CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング法、

(12) 受容体がCD72またはその塩である上記(11)項記載のスクリーニング法、

(13) 外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有することを特徴とするT細胞の反応性が亢進したトランスジェニック非ヒト動物

説明する。

本発明で用いられるCD 1 0 0およびCD 7 2としては、ヒト、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）および魚類などのあらゆる組織（たとえば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドが挙げられ、CD 1 0 0としては、配列番号：

1または配列番号：3、CD 7 2としては配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。配列番号：1、3、5または

7で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1、3、5または7で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、CD 7 2としては、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性、抗体産生能などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、

ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。CD 1 0 0としては、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性、抗体産生活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

本明細書におけるCD 7 2およびCD 1 0 0はペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。例えば、

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが挙げられる。

本発明で用いられるCD72およびCD100の塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるCD72およびCD100は、公知の方法〔ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー（The Journal of Immunology）、144巻、4870-4877頁（1990）；ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー（The Journal of Immunology）、149巻、880-886頁（1992）；プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc Natl Acad Sci USA）93巻、（1996年）11780-11785頁；ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Journal of Biological Chemistry）271巻、（1996年）33376-33381頁〕に準じた方法、即ち、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ヒト、温血動物、魚類などの組織または細胞から製造する場合、ヒト、温血動

物、魚類などの組織または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

- 5 上記したように本発明で用いられるCD 7 2およびCD 1 0 0は、自体公知のポリペプチドの合成法に従って、あるいはポリペプチドを含有するポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、ポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分と
- 10 を縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- 15 ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- 20 ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

- また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせてポリペプチド(CD 7 2, CD 1 0 0)を精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。
- 25

CD 7 2およびCD 1 0 0のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、

4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルペンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドを取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBTなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰

り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化さ

れたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に $-20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

CD72およびCD100のアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

CD72およびCD100のエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の

α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

5 本発明で用いられるCD72をコードするDNAとしては、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、本発明で用いられるCD100をコードするDNAとしては、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するリガンド蛋白質をコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse
10 Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で、配列番号：5または配列番号：7（または、配列番号：1または配列番号：3）で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNA、(2)
20 遺伝コードの縮重のため、配列番号：5または配列番号：7（または、配列番号：1または配列番号：3）で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1% SDSである。

本発明で用いられるCD 7 2またはCD 1 0 0をコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

CD 7 2またはCD 1 0 0を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、ポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えばポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化された本発明で用いられるCD 7 2またはCD 1 0 0をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明で用いられるCD 7 2またはCD 1 0 0の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明で用いられるCD 7 2またはCD 1 0 0をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Trpプロモーター、
5 T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫
10 細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。
20

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、
25 宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α （MF α ）・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたCD72またはCD100をコードするDNAを含

有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 ・
5 DH.1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエ
ンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻,
160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic
Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・
モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻,
10 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロ
ジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics),
39巻, 440(1954)], 大腸菌DH10B細胞 [Focus 12, p19
(1990) Low, D他] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M
15 I114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・
オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(198
4)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces
cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B
20 -12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー
(Nature), 315巻, 592(1985)]。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由
来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸
25 由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra
brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイ
ルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) など
が用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、S
f21細胞 [以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 13巻, 2

13-217頁(1977年)]などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO、DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(dhfr⁻CHO細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞、
5 ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞、マウスB細胞株WEHI231細胞、P3U1プラズマサイトなどが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 1
10 7巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。

15 酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6巻, 47-55頁(1988年)などに記載の方法に従って
20 行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法[Felgner, P. L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America), 84巻, 7413頁
25 (1987年)]、リン酸カルシウム法[Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456-467頁(1973年)]、電気穿孔法[Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル(EMBO J.), 1巻, 841-

845頁(1982年)等が挙げられる。

このようにして、本発明で用いられるCD72またはCD100をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

5 なお、動物細胞を用いて、本発明で用いられるCD72またはCD100等を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことによりポリペプチド等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、*d h f r*遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、*d h f r*遺伝子とともに、ポリペプチドまたはその部分ペプチド等をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

10 上記の形質転換体をポリペプチド等(CD72, CD100)をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、ポリペプチド等を生成、蓄積せしめることによって、ポリペプチド等を製造することができる。

20 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

25 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 19

72} が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 10 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃
15 ～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、
20 必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of The American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of The Society for The Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60

時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

- 5 上記培養物から本発明で用いられるCD72またはCD100を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明で用いられるCD72またはCD100を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌
10 体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

- 15 培養液中に本発明で用いられるCD72またはCD100が分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明で用いられるCD72またはCD100の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や
20 溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法や
25 クロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明で用いられるCD72またはCD100が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明で用いられるCD 7 2またはCD 1 0 0を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、
5 プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

10 [CD 1 0 0とCD 7 2との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法（リガンド・レセプターアッセイ系）]

CD 1 0 0またはその塩およびCD 7 2またはその塩を用いることを特徴とする、CD 1 0 0またはその塩とCD 7 2またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、またはCD 1 0 0またはその塩および
15 CD 7 2またはその塩を用いることを特徴とする、CD 1 0 0またはその塩とCD 7 2またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット（以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する）について以下に詳述する。

受容体としてCD 7 2またはその塩を用いるか、または組換え型CD 7 2の発現系を構築し、該発現系を用いたCD 1 0 0またはその塩との結合アッセイ系（リ
20 ガンド・レセプターアッセイ系）を用いることによって、CD 1 0 0またはその塩とCD 7 2またはその塩との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、CD 7 2を介して免疫反応促進活性〔例えば、抗原特
25 異的IgGなどの抗体産生；TD（T細胞依存性）抗原に対する抗体産生、T細胞の増殖性、IL-4産生、インターフェロンガンマ産生などのT細胞反応性；IL-12産生などの樹状細胞反応性などを促進する活性または抑制する活性など〕を有する化合物（即ちCD 7 2アゴニスト）と該免疫反応促進活性を有しない化合物（即ちCD 7 2アンタゴニスト）などが含まれる。

「CD100またはその塩とその受容体（例、CD72またはその塩）との結合性を変化させる」とは、CD100またはその塩とその受容体（例、CD72またはその塩）との結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

5 すなわち、本発明は、（i）CD72またはその塩に、CD100またはその塩を接触させた場合と（ii）上記したCD72またはその塩に、CD100またはその塩および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

10 本発明のスクリーニング方法においては、（i）上記したCD72またはその塩に、CD100またはその塩を接触させた場合と（ii）上記したCD72またはその塩に、CD100またはその塩および試験化合物を接触させた場合における、例えば該CD72またはその塩に対するリガンドの結合量や抗体産生などの免疫反応促進活性などを測定して、比較する。

15 本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識したCD100またはその塩を、上記したCD72またはその塩に接触させた場合と、標識したCD100またはその塩および試験化合物をCD72またはその塩に接触させた場合における、標識したCD100またはその塩の該CD72またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20 ②標識したCD100またはその塩を、CD72またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したCD100またはその塩および試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したCD100またはその塩の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 ③標識したCD100またはその塩を、CD72をコードするDNAを含有する

形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD72またはその塩に接触させた場合と、標識したCD100またはその塩および試験化合物をCD72をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD72またはその塩に接触させた場合における、標識したCD100またはその塩のCD72またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④CD72またはその塩を活性化する化合物（例えば、CD100またはその塩）をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、CD72またはその塩を活性化する化合物および試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させた場合における、CD72またはその塩を介した免疫反応促進活性〔例えば、抗原特異的IgGなどの抗体産生；TD（T細胞依存性）抗原に対する抗体産生、T細胞の増殖性、IL-4産生、インターフェロンガンマ産生などのT細胞反応性；IL-12産生などの樹状細胞反応性などを促進する活性または抑制する活性など〕を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤CD72またはその塩を活性化する化合物（例えば、CD100またはその塩など）をCD72をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD72またはその塩に接触させた場合と、CD72またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を、CD72をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD72またはその塩に接触させた場合における、CD72またはその塩を介する免疫反応促進活性〔例えば、抗原特異的IgGなどの抗体産生；TD（T細胞依存性）抗原に対する抗体産生、T細胞の増殖性、IL-4産生、インターフェロンガンマ産生などのT細胞反応性；IL-12産生などの樹状細胞反応性などを促進する活性または抑制する活性など〕を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるCD 7 2としては、上記のCD 7 2を含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒト、温血動物、魚類などの臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたCD 7 2またはその塩などが適している。

CD 7 2またはその塩を製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、CD 7 2またはその塩を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

CD 7 2またはその塩を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

CD 7 2またはその塩を含有する細胞としては、CD 7 2またはその塩を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン

(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500 rpm~3000 rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000 rpm~30000 rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したCD 7 2またはその塩と細胞由来のリ

ン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該CD 7 2またはその塩を含有する細胞や膜画分中のCD 7 2またはその塩の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性

(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

CD 100 またはその塩と CD 72 またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当な CD 72 画分
5 と、標識したリガンド (CD 100) が用いられる。CD 72 画分としては、天然型の CD 72 画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型 CD 72 画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド (CD 100)、標識したリガンド (CD 100) アナログ化合物などが用いられる。例えば [^3H]、[^{125}I]、
10 [^{14}C]、[^{35}S]などで標識されたリガンド (CD 100) などを利用することができる。特に、ボルトン-ハンター試薬を用いて公知の方法で調製した CD 100 または CD 100 誘導体の標識体を利用することもできる。

具体的には、CD 100 またはその塩と CD 72 またはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず CD 72 またはその塩を含有
15 する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適した緩衝液に懸濁することによりレセプター標品を調製する。緩衝液には、pH 4～10 (望ましくは pH 6～8) のリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液などのリガンドとレセプターとの結合を阻害しない緩衝液であればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤を緩衝液に加えることもできる。さらに、
20 プロテアーゼによる CD 72 や CD 100 の分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml～10 ml の該レセプター溶液に、一定量 (5000 cpm～500000 cpm) の標識した CD 100 を添加し、同
25 時に 10^{-4} ～ 10^{-1} μM の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB)を知るために大過剰の未標識の CD 100 またはその塩を加えた反応チューブも用意する。反応は 0℃ から 50℃、望ましくは 4℃ から 37℃ で 20 分から 24 時間、望ましくは 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同緩衝液で洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチ

レーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - NSB$)を100%とした時、特異的結合量($B - NSB$)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- 5 また、CD72またはその塩とCD100またはその塩との結合を測定する方法として、BIAcore (アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いることもできる。この方法では、CD100またはその塩あるいはその誘導体を装置に添付のプロトコルに従ったアミノカップリング法によってセンサーチップに固定し、CD72またはその塩を含有する細胞またはCD72をコードするDNA
- 10 Aを含有する形質変換体から精製したCD72またはその塩またはCD72またはその塩を含む膜画分、あるいは精製したCD72またはその塩またはCD72またはその塩を含む膜画分および試験化合物を含むリン酸緩衝液またはトリス緩衝液などの緩衝液をセンサーチップ上を毎分2-20 μ lの流量で通過させる。センサーチップ上のCD100またはその塩とCD72またはその塩とが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによってCD72またはその塩とCD100またはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法は、CD72またはその塩をセンサーチップに固定し、CD100またはその塩、またはCD100またはその塩および試験化合物を含むリン酸緩衝液または
- 15 トリス緩衝液などの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。
- 20

- 25 CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、CD72またはその塩を介する免疫反応促進活性[例えば、抗原特異的IgGなどの抗体産生；TD (T細胞依存性) 抗原に対する抗体産生、T細胞の増殖性、IL-4産生、インターフェロンガンマ産生などのT細胞反応性；IL-12産生などの樹状細胞反応性などを促進する活性または抑制する活性など]を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、CD 7 2 またはその塩を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当な緩衝液に交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した

5 産物をそれぞれの方法に従って定量する。免疫反応促進活性の指標とする物質(例えば、抗原特異的 I g G 量、インターフェロンガンマ、インターロイキン 1 2 など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。

抗体産生などの免疫反応促進活性を測定してスクリーニングを行なうには、適

10 当なCD 7 2 またはその塩を発現した細胞が用いられる。CD 7 2 またはその塩を発現した細胞としては、B細胞や前述の組換え型CD 7 2 発現細胞株などが望ましい。形質変換体であるCD 7 2 発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成

15 化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

上記のリガンド・レセプターアッセイ系について、さらに具体的に記載すると以下のようなアッセイ系が用いられる。

(1) 受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のクラス

20 スイッチ、I g M以外クラスの抗体 I g G、I g A、I g D、I g Eのいずれかの産生、分泌が促進される現象が生じる。産生、分泌された抗体量はE L I S A 法により、直接的、または間接的に標識した抗 I g 抗体を用いることによって受容体アゴニストの抗体産生促進活性を測定することができる。この反応を利用してCD 1 0 0のCD 7 2 発現細胞に対する抗体産生促進活性を測定することがで

25 きる。具体的には、後述の実施例 2 およびそれに準じた方法により行われる。ここにおいて、CD 1 0 0 またはその塩、あるいはCD 1 0 0 またはその塩および試験化合物を添加し、CD 1 0 0 またはその塩の単独投与に比べて抗体産生促進活性に変化が生じることを観察することによってCD 1 0 0 またはその塩とCD 7 2 またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることがで

きる。このとき、CD100によるCD72発現細胞へ抗体産生促進活性を抑制する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、CD72発現細胞への抗体産生促進活性を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- 5 スクリーニング法の一例についてより具体的に以下に述べる。後述の実施例2に述べた方法によって調製した 1×10^5 cells/well 脾臓由来休止B細胞を抗CD40 モノクローナル抗体、IL-4 100 units/ml と共に、パラホルムアルデヒドで固定した正常、CD100を発現するCHO細胞 (2×10^4 cells/well)の存在下で、平底96穴マイクロタイター
- 10 プレートで約7日間培養する。IgM またはIgG1免疫グロブリンの産生をELISA法により測定する。具体的には、培養液または対照のIgM, IgGを0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)を用いて希釈し、EIA用96穴イムノプレート(マキシソープ: ヌンク社)の各ウエルに100 μ lずつ注入して約4℃で一晩放置して添着する。各ウエルを緩衝液A(0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で洗浄後、緩衝液B(0.1%BSA、0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で希釈した酵素標識した抗IgM, IgG, IgA, IgD, IgE抗体溶液100 μ lを加えて25℃
- 15 でさらに約2時間反応させる。各ウエルを緩衝液Aで洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質溶液(1mg/mlフォスファターゼ基質(シグマ)、100mM Tris (pH9.5)、100mM NaCl、5mM MgCl₂)を100 μ l加え25℃で30分間反応させる。マイクロプレート用自動比色計を用い、405nmにおける吸光度を測定する。CD100またはその塩のみを加えた実験区の吸光度を100%、CD100またはその塩を加えなかった実験区の吸光度を0%とし、CD100またはその塩による抗体産生促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。抗体産生促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗
- 20 阻害能力のある候補物質として選択することができる。
- 25

CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、CD72またはその塩、CD72またはその塩を含有する細胞、あるいはCD72またはその塩を含有する細胞の

膜画分、およびCD100またはその塩を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

- 5 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、
0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②CD72標品

- 10 CD72またはその塩を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したCD100またはその塩。

- 15 適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、
用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④リガンド標準液

CD100またはその塩を0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

20 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したCD72またはその塩を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

- 25 ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識したCD100
またはその塩を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知る
ためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

5 PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

10 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはCD72またはその塩を介して抗体産生などの免疫反応促進活性を有する化合物またはその塩（いわゆるCD72アゴニスト）、あるいは該免疫反応促進活性を有しない化合物（いわゆるCD72アンタゴニスト）である。該化合物としては、
15 ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記CD72アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の（i）または（ii）に従えばよい。

20 （i）前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記したCD72を介する抗体産生などの免疫反応促進活性を有しているか否かを測定する。免疫反応促進活性を有する化合物またはその塩はCD72アゴニストであり、該活性を有し
25 ない化合物またはその塩はCD72アンタゴニストである。

（ii）（a）試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させ、上記CD72またはその塩を介した抗体産生などの免疫反応促進活性を測定する。免疫反応促進活性を有する化合物またはその塩はCD72アゴニストである。

（b）CD72またはその塩を活性化する化合物（例えば、CD100またはCD

72アゴニストなど)をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、CD72またはその塩を活性化する化合物および試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させた場合における、CD72またはその塩を介した抗体産生などの免疫反応促進活性を測定し、比較する。CD72またはその塩を活性化する化合物による免疫反応促進活性を減少させ得る化合物またはその塩はCD72アンタゴニストである。

該CD72アゴニストは、CD72またはその塩に対するCD100またはその塩が有する生理活性と同様の作用を有しているので、CD100またはその塩と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、CD72アンタゴニストは、CD72またはその塩に対するCD100またはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

さらにCD72またはその塩はCD72アンタゴニストと同様、CD100またはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、安全で低毒性な医薬として有用である。

CD100またはその塩はクラススイッチを誘導する作用および抗体産生促進作用などに関与していることから、抗体産生誘導剤、免疫賦活剤などとして用いることができる。したがって、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物のうち、CD72アゴニストはウイルスによる感染症または疾病(かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、带状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人T細胞白血病(ATL)、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど)、細菌または真菌による感染症または疾病(細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兔病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など)、癌(口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色

腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など)などの予防・治療薬などとして用いることができ、CD72アンタゴニスト(またはCD72またはその塩)は異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病(アトピー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支炎、肺アスペルギルス症、寄生虫疾患、木村氏病、高IgE症候群、Wiskott-Aldrich症候群、胸腺形成不全症、Hodkin病、肝硬変、急性肝炎、慢性関節リウマチ、インシュリン依存性糖尿病、全身性エリトマトーデス、強皮症、不妊症、子宮内膜症、自己免疫性甲状腺疾患重症筋無力症、橋本病、Basedow病、悪性貧血、Addison病、男性不妊症、多発性硬化症、Goodpasture症候群、天疱瘡、類天疱瘡、重症筋無力症、水晶体性眼炎、交感性眼炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、自己免疫性白血球減少症、Felty症候群、自己免疫性リンパ球減少症、潰瘍性大腸炎、Sjogren症候群、全身性自己免疫疾患、原発性胆汁性肝硬変症、ルポイド肝炎など)の予防・治療薬などとして用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ピリジンジールアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩あげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル

酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコ

ール)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から300mg、より好ましくは約3.0から50mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人(体重60kgとして)への投与においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。

他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

CD72またはその塩を医薬として用いる場合、上記の本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合と同様にして製剤化および実施することができる。

[CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物]

CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物(以下、CD100遺伝子発現不全非ヒト動物と称することがある)は、不活性化CD100遺伝子配列を有する非ヒト動物ES細胞を用いて製造できる。

該不活性化CD100遺伝子配列を有する非ヒト動物ES細胞とは、非ヒト動物ES細胞が有するCD100遺伝子に人為的に変異を加えることにより、遺伝子の発現能を抑制するか、もしくは該遺伝子がコードしているCD100の活性を実質的に喪失させることにより、遺伝子が実質的にCD100の発現能を有さない不活性化された（以下、ノックアウト遺伝子と称することがある）非ヒト動物のES細胞をいう。

非ヒト動物としては、CD100遺伝子を有するヒト以外の動物ならば、いかなる動物でもよいが、非ヒト哺乳動物が好ましい。非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。非ヒト哺乳動物のなかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが特に好ましい。

CD100遺伝子としては、動物から単離、抽出されたゲノム由来のCD100遺伝子であってもよく、あるいは、遺伝子工学的手法を用いてクローニングされたCD100 cDNAであってもよい。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するマウス由来CD100蛋白質の遺伝子としては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を有する遺伝子などが用いられ、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来CD100蛋白質の遺伝子としては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列を有する遺伝子などが用いられる。これらの遺伝子は、前述した方法に従って入手することができる。

CD100遺伝子に人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該遺伝子配列の一部又は全部の削除、他遺伝子を挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらすか、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することによりCD100のノックアウト遺伝子を作製することができる。

不活性化CD100遺伝子配列を有する非ヒト動物胚幹細胞（以下、CD100遺伝子不活性化ES細胞またはノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、薬剤耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子など、好ましくは、オマイシン耐性遺伝子など）、あるいは、
5 レポーター遺伝子（例えば、lacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）など、好ましくは、lacZなど）等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を作製する。レポーター遺伝子を挿入してエキソンの機能を破壊する場合、該レポーター遺伝子は、
10 CD100プロモーターの制御下で発現するように挿入することが好ましい。

さらに、遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖を、例えば、相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞についてCD100遺伝子上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用したCD100遺伝子以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、ノックアウトES細胞を選別
15 することにより得ることができる。

また、相同組換え法等によりCD100遺伝子を不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また Evans とKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明
25 らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス（C57BL/6とDBA/2とのF1）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に

加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

- 5 また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

10 また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

15 ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

20 また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

25 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1

mM EDTA) 処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合は、その培養細胞は放棄することが望まれる。

- 5 E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、E S細胞を分化させて得られるCD100遺伝子発現不全細胞は、インビトロにおけるCD100の細胞生物学的検討において有用である。
- 10
- 15 不活性化CD100遺伝子配列を有するトランスジェニック非ヒト動物（以下、遺伝子発現不全非ヒト動物と称す場合がある）とは、例えば、前記の不活性化CD100遺伝子配列を有する非ヒト動物胚幹細胞由来の細胞を用いて遺伝子工学的に作出されたものであり、例えば、生殖細胞および体細胞に胚形成初期に該不活性化CD100遺伝子配列を導入された非ヒト動物である。
- 20 該非ヒト動物としては、前記と同様のものが用いられる。
- CD100遺伝子をノックアウトさせるには、前記のターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、ターゲッティングベクターの不活性化されたCD100遺伝子配列を遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上のCD100遺伝子と入れ換えることにより行うことができる。
- 25 CD100遺伝子がノックアウトされた細胞は、CD100遺伝子上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来のCD100遺伝子以外の近傍領域のDNA配列とをプライマー

としたPCR法による解析で判定することができる。

非ヒト動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、CD100遺伝子が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を胚形成の初期の適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト動物の子宮に移植する。

作出された動物は正常なCD100遺伝子座をもつ細胞と人為的に変異したCD100遺伝子座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異したCD100遺伝子座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えたCD100遺伝子座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、CD100ヘテロ発現不全個体であり、CD100ヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔からCD100ホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法で遺伝子溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト動物に比べて、遺伝子相同組換えによりCD100遺伝子座に変異のあるものを選択することにより得られる。

CD100遺伝子発現不全非ヒト動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

このようにしてCD100遺伝子がノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該遺伝子がノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従って行うことができる。すなわち、該不活化遺伝子配列の保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化遺伝子配列を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得することができる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホ

モザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化遺伝子配列を有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代することができる。このようにして得られた該不活化遺伝子配列を有する動物の子孫もCD100遺伝子発現不全非ヒト動物に含まれる。

このようにCD100遺伝子が不活性化された非ヒト動物胚幹細胞は、CD100遺伝子発現不全非ヒト動物を作出する上で、非常に有用である。

上記のように作出されたCD100遺伝子発現不全非ヒト動物は、①TD（T細胞依存性）抗原に対する抗体産生能が低下（後述の実施例6）、②T細胞の増殖性、IL-4産生能、INF- γ 産生能などのT細胞の反応性が喪失（後述の実施例7）③IL-12産生能などの樹状細胞の反応性が喪失（後述の実施例10）した非ヒト動物であり、CD100の欠損に起因する疾病、例えば、CD100により誘導され得る種々の生物活性の欠失に基づく、CD100の生物活性の不活性化に起因する疾病、例えば、ウイルスによる感染症または疾病（かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、带状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人T細胞白血病（ATL）、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど）、細菌または真菌による感染症または疾病（細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兔病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など）、癌（口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など）のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

すなわち、CD100遺伝子発現不全非動物は、該疾病の予防・治療薬のスクリーニングに用いることができる。

本発明のスクリーニング方法において用いられるCD100遺伝子発現不全非ヒト動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、CD100遺伝子発現不全非ヒト動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状等の変化を指標として試験化合物の予防・治療効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、癌の予防・治療薬をスクリーニングする場合、CD100遺伝子発現不全非ヒト動物に例えばキーホールリンペットヘモシアニンを投与した後、試験物質を経時的に腹腔、皮下、静脈内等に投与し、血中内のインターフェロンガンマ量やIL-12量を測定することによりスクリーニングすることができる。さらに、腫瘍を腹腔、皮下、静脈内に移植し、試験物質を経時的に腹腔、皮下、静脈内等に投与し、腫瘍体積や生存期間を測定することによりスクリーニングすることができる。

本発明のCD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いたスクリーニング方法により得られる予防・治療薬は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、CD100欠損によって引き起こされる疾患の予防・治療効果を有するので、CD100の欠損によって引き起こされる疾病に対する安全で低毒性な治療・予防薬などの医薬として有用である。また、該化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、

あるいは有機酸（例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

5 本発明のCD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いたスクリーニング方法は上記したCD100とCD72との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法（リガンド・レセプターアッセイ系）と組み合わせて実施されてもよい。すなわち、本発明はCD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物（特に、CD100とCD72との結合性を促進させる化合物またはCD100に置き換わってCD72に結合する化合物）またはその塩のスクリーニング法を提供する。

10 ここで、リガンド・レセプターアッセイ系を一次スクリーニングとしてCD100とCD72との結合性を変化させる化合物を候補化合物として選択した後、CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いた二次スクリーニング系で該候補化合物の予防・治療効果を試験してもよいし、CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いたスクリーニング系を一次スクリーニングとして候補化合物を選択した後、リガンド・レセプターアッセイ系の二次スクリーニングに付し、得られたCD100とCD72との結合性を変化させる化合物を本発明の予防・治療剤の候補化合物として選択してもよい。

20 本発明のCD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いたスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩を上述の治療・予防薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができ、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80 TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症

状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

さらに、本発明は、CD100遺伝子発現不全非ヒト動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするCD100プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法において用いられるCD100遺伝子発現不全非ヒト動物としては、前記したCD100遺伝子発現不全非ヒト動物の中でも、レポーター遺伝子を導入することにより不活性化されたCD100遺伝子配列を有し、該レポーター遺伝子がCD100プロモーターの制御下で発現し得るものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）がさらに好ましく用いられる。

CD100の構造遺伝子をレポーター遺伝子で置換されたCD100発現動物では、レポーター遺伝子がCD100プロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、CD100プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、CD100をコードする遺伝子領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、CD100の発現する組織で、CD100の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド（X-gal）のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便にCD100の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、CD100欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-

galを含む染色液で、室温または7℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

- 5 このように、CD100遺伝子発現不全非ヒト動物は、CD100プロモーターを促進または阻害不活化する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、CD100発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

- 10 上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、CD100プロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

- 15 CD100プロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、CD100の発現を促進し、CD100の機能を亢進することができるので、例えば、ウイルスによる感染症または疾病（かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、带状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人T細胞白血病（ATL）、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど）、細菌または真菌による感染症または疾病（細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兔病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など）、癌（口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、
20 脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など）などの各種疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

25 一方、CD100プロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、CD100の発現を阻害し、CD100の機能を阻害することができるので、例えば、異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病（例、アトピー性

喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支炎、肺アスペルギールス症、寄生虫疾患、木村氏病、高IgE症候群、Wiskott-Aldrich症候群、胸腺形成不全症、Hodkin病、肝硬変、急性肝炎、慢性関節リウマチ、インシュリン依存性糖尿病、全身性エリトマトーデス、強皮症、
5 不妊症、子宮内膜症、自己免疫性甲状腺疾患重症筋無力症、橋本病、Basedow病、悪性貧血、Addison病、男性不妊症、多発性硬化症、Goodpasture症候群、天疱瘡、類天疱瘡、重症筋無力症、水晶体性眼炎、交感性眼炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、自己免疫性白血球減少症、Felty症候群、自己免疫性リンパ球減少症、潰瘍性大腸炎、Sjogren
10 症候群、全身性自己免疫疾患、原発性胆汁性肝硬変症、ルポイド肝炎などの各種疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を上述の治療・予防剤として使用する場合、前記と同様に実施することができる。

15 〔CD100遺伝子転移動物〕

外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物（以下、CD100遺伝子転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む生殖細胞などに対して、好ましくは、非ヒト動物の発生における胚形成初期の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階で、かつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム
20 法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするCD100遺伝子を転移することによって作出することができる。また、該CD100遺伝子転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする外来性CD
25 D100遺伝子を転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の生殖細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることによりCD100遺伝子転移動物を作成することもできる。

非ヒト動物としては、前記と同様のものが用いられる。

外来性CD100遺伝子とは、非ヒト動物の体内に存在しているCD100遺

伝子ではなく、いったん動物から単離・抽出されたCD100遺伝子、あるいは、遺伝子工学的手法を用いてクローニングされたCD100 cDNAなどが用いられる。

5 具体的には、前記した配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列を有する遺伝子などが用いられる。

CD100遺伝子の変異遺伝子（以下、変異CD100遺伝子と略記する）としては、元のCD100遺伝子の塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたCD100遺伝子などが用いられ、また、CD100遺伝子の異常遺伝子（以下、異常CD100遺伝子と略記する）も含まれる。

10 該異常CD100遺伝子としては、異常なCD100を発現させるCD100遺伝子を意味し、例えば、正常なCD100の機能を抑制するCD100を発現させるCD100遺伝子などが用いられる。

15 外来性CD100遺伝子は、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの動物由来のものであってもよい。

外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAとしては、外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

20 CD100遺伝子を対象動物に転移させるにあたっては、該CD100遺伝子を動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ヒトCD100遺伝子を転移させる場合、これと相同性が高いCD100遺伝子を有する各種非ヒト動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のCD100遺伝子が発現させる各種プロモーターの下流に、ヒトCD100遺伝子を結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象動物の受精卵、
25 例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってCD100遺伝子を高発現するCD100遺伝子転移動物を作出することができる。

CD100発現用ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モ

ロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

- 5 上記のCD100遺伝子発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するプロモーター、各種動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）由来のものとしては、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、
- 10 心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子 1α （EF- 1α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられるが、好ましくは
- 20 全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1α （EF- 1α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどを用いることができる。また、特定の臓器や組織で高発現することが可能なインシュリンプロモーター、アルブミンプロモーター、イミューノグロブリンプロモーターなども用いることができる。
- 25

上記ベクターは、CD 1 0 0 遺伝子転移動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来、各種哺乳動物および鳥類由来の各CD 1 0 0 遺伝子の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのSV 4 0ターミネターなどが用いられる。

その他、目的CD 1 0 0 遺伝子をさらに高発現させる目的で遺伝子のスプライシングシグナル、イミュノグロブリン遺伝子などのエンハンサー領域、真核細胞の遺伝子のイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常なCD 1 0 0の翻訳領域は、各種動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、ヒトなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムライブラリーよりゲノム遺伝子の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補CD 1 0 0 遺伝子を原料として取得することが出来る。また、外来性異常CD 1 0 0 遺伝子は、上記の細胞または組織より得られた正常CD 1 0 0の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異させることにより作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階におけるCD 1 0 0 遺伝子の転移は、対象動物の生殖細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。CD 1 0 0 遺伝子転移後の作出動物の生殖細胞において、CD 1 0 0 遺伝子が存在することは、作出動物の後代がすべて、その生殖細胞および体細胞のすべてにCD 1 0 0 遺伝子を保持することを意味する。CD 1 0 0 遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその生殖細胞および体細胞のすべてにCD 1 0 0 遺伝子を有する。

外来性正常CD 1 0 0 遺伝子を転移させた非ヒト動物は、交配によりCD 1 0 0 遺伝子を安定に保持することを確認して、該CD 1 0 0 遺伝子保有動物として

通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精卵細胞段階におけるCD100遺伝子の転移は、対象動物の生殖細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。CD100遺伝子転移後の作出動物の生殖細胞においてCD100遺伝子が過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその生殖細胞および体細胞の全てにCD100遺伝子を過剰に有することを意味する。CD100遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその生殖細胞および体細胞の全てにCD100遺伝子を過剰に有する。導入CD100遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該CD100遺伝子を過剰に有するように繁殖継代することができる。このようにして得られた子孫も本発明の動物に含まれる。

このように得られた外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物は、T細胞のインターフェロンガンマ産生能および増殖性が上昇し、T細胞の反応性が亢進した非ヒト動物である（後述の実施例11）。

正常CD100遺伝子を有する非ヒト動物は、正常CD100遺伝子が高発現させられており、内在性の正常CD100遺伝子の機能を促進することにより最終的にCD100機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、正常CD100遺伝子転移動物を用いて、CD100機能亢進症や、CD100関連疾患、例えば、異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病（例、アトピー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支炎、肺アスペルギルス症、寄生虫疾患、木村氏病、高IgE症候群、Wiskott-Aldrich症候群、胸腺形成不全症、Hodkin病、肝硬変、急性肝炎、慢性関節リウマチ、インシュリン依存性糖尿病、全身性エリトマトーデス、強皮症、不妊症、子宮内膜症、自己免疫性甲状腺疾患重症筋無力症、橋本病、Basedow病、悪性貧血、Addison病、男性不妊症、多発性硬化症、Goodpasture症候群、天疱瘡、類天疱瘡、重症筋無力症、水晶体性眼炎、交感性眼炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、自己免疫性白血球減少症、Felty症候群、自己免疫性リンパ球減少症、潰瘍性大腸炎、Sjogren症候群、全身性自己免疫疾

患、原発性胆汁性肝硬変症、ルポイド肝炎などの各種疾病の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、外来性正常CD100遺伝子を転移させた動物は、遊離CD100の増加症状を有することから、上記CD100関連疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。例えば、上記マウスにジニトロフェニルオバルブミンなどの外来抗原などを接種し、一方で試験物質を適宜投与することにより外来抗原に対する抗体価が下がるかどうかを測定することによって阻害物質のスクリーニングを行うことが可能である。より具体的には自己免疫疾患等で上昇すると考えられるインターフェロンガンマなどの血中サイトカイン量を測定することによっても可能である。

一方、外来性異常CD100遺伝子を有する非ヒト動物は、交配によりCD100遺伝子を安定に保持することを確認して該CD100遺伝子保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的CD100遺伝子を前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のCD100遺伝子工学的手法によって作製することができる。

受精卵細胞段階における異常CD100遺伝子の転移は、対象動物の生殖細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。CD100遺伝子転移後の作出動物の生殖細胞において異常CD100遺伝子が存在することは、作出動物の子孫が全てその生殖細胞および体細胞の全てに異常CD100遺伝子を有することを意味する。CD100遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫は、その生殖細胞および体細胞の全てに異常CD100遺伝子を有する。導入CD100遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該CD100遺伝子を有するように繁殖継代することができる。

異常CD100遺伝子を有する非ヒト動物は、異常CD100遺伝子が高発現させられており、内在性の正常CD100遺伝子の機能を阻害することにより最終的にCD100機能不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができ、例えば、異常CD100遺伝子転移動物を用いて、CD100

機能不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、異常CD100遺伝子高発現動物は、CD100機能不応症における異常CD100による正常CD100機能阻害
5 (dominant negative作用)を解明するモデルとなる。また、外来異常CD100遺伝子を転移させた動物は、正常CD100の機能が損なわれることから、ウイルスによる感染症または疾病（かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、帯状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、
10 エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人T細胞白血病（ATL）、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど）、細菌または真菌による感染症または疾病（細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兔病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など）に対する抵抗性が弱
15 まったり、癌（口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など）の増殖性が促進される動物のモデルになると考えられ、これらの疾病に対する治療薬
20 のスクリーニング試験にも利用可能である。

本発明の外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物を用いたスクリーニング方法は上記したCD100とCD72との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法（リガンド・レセプターアッセイ系）と組み合わせて実施されてもよい。
25 すなわち、本発明は外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物（特に、CD100とCD72との結合性を阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング法を提供する。

ここで、リガンド・レセプターアッセイ系を一次スクリーニングとしてCD 100とCD 72との結合性を変化させる化合物を候補化合物として選択した後、外来性CD 100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物を用いた二次スクリーニング系で該候補化合物の予防・治療効果を試験してもよいし、外来性CD 100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物を用いたスクリーニング系を一次スクリーニングとして候補化合物を選択した後、リガンド・レセプターアッセイ系の二次スクリーニングに付し、得られたCD 100とCD 72との結合性を変化させる化合物を本発明の予防・治療剤の候補化合物として選択してもよい。

また、上記2種類のCD 100遺伝子転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②CD 100遺伝子転移動物の組織中のCD 100遺伝子もしくはRNAを直接分析するか、またはCD 100遺伝子高発現組織を分析することによる、CD 100により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、

③CD 100遺伝子を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤変異CD 100の単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、CD 100遺伝子転移動物を用いて、CD 100機能不応症を含む、CD 100関連疾患の臨床症状を調べることができ、また、CD 100関連疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、CD 100遺伝子転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、CD 100遺伝子転移細胞の取得、その培養

またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、CD100産生細胞の特定化、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、CD100およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

- 5 さらに、CD100遺伝子転移動物を用いて、CD100機能不応症を含む、CD100関連疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。

- 10 また、CD100遺伝子転移動物または外来性CD100遺伝子発現ベクターを用いて、CD100関連疾患のCD100遺伝子治療法を検討、開発することが可能である。遺伝子治療法を検討する際には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、ヘルペスウイルスベクターなどのウイルスベクターあるいは、膜融合リポソーム法などが用いられる。

- 15 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
20	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
25	Y	: チミンまたはシトシン
	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
	W	: チミンまたはアデニン

	S	: シトシンまたはグアニン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
5	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
10	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	GlyまたはG	: グリシン
	AlaまたはA	: アラニン
	ValまたはV	: バリン
15	LeuまたはL	: ロイシン
	IleまたはI	: イソロイシン
	SerまたはS	: セリン
	ThrまたはT	: スレオニン
	CysまたはC	: システイン
20	MetまたはM	: メチオニン
	GluまたはE	: グルタミン酸
	AspまたはD	: アスパラギン酸
	LysまたはK	: リジン
	ArgまたはR	: アルギニン
25	HisまたはH	: ヒスチジン
	PheまたはF	: フェニルアラニン
	TyrまたはY	: チロシン
	TrpまたはW	: トリプトファン
	ProまたはP	: プロリン

	AsnまたはN	: アスパラギン
	GlnまたはQ	: グルタミン
	pGlu	: ピログルタミン酸
	Me	: メチル基
5	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	Bom	: ベンジルオキシメチル
10	NMP	: N-メチルピロリドン
	PAM	: フェニルアセトアミドメチル

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	Tos	: p-トルエンスルフォニル
15	HONB	: N-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	Bzl	: ベンジル
	Cl ₂ -Bzl	: ジクロロベンジル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
20	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	TFA	: トリフルオロ酢酸
25	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
	Bum	: ターシャリープトキシメチル
	Trt	: トリチル
	BSA	: ウシ血清アルブミン

CHAPS : 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ]-1-プロパ
ンスルホナート

E 6 4 : (L-3-trans-カルボキオキシラン-2-カルボニル) L-ロイシル
-アグマチン

5 DNP-OVA : ジニトロフェニルオバルブミン

DNP-BSA : ジニトロフェニルウシ血清アルブミン

ELISA : エンザイムリンクドイミュノソーベントアッセイ

EIA : エンザイムイミュノソーベントアッセイ

PBS : フォスフェートバッファードサリーン

10 LPS : リポポリサッカライド

conA : コンカナバリンA

本願明細書の配列番号は以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕 マウスCD100のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕 マウスCD100の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：3〕 ヒトCD100のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕 ヒトCD100の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕 マウスCD72のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕 マウスCD72の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕 ヒトCD72のアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：8〕 ヒトCD72の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕 参考例1に記載されるmCD100-Fcを作製するために使
用されたN端側のプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕 参考例1に記載されるmCD100-Fcを作製するために
使用されたC端側のプライマーの塩基配列を示す。

25

実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これら
は本発明の範囲を限定するものではない。

参考例1 CD40刺激により発現が増強されるCD100の単離

1 X 10⁸個のマウスB細胞株WEHI 231細胞を抗CD40抗体、HM40-3（ファージン社）を用いて8時間刺激した。刺激しない細胞とした細胞より全RNAをグアニジンイソチオシアネートフェノール法により単離し、
5 mRNAをOligo(dT)結合マグネチックビーズ（プロメガ）を用いて精製した。PCR-SELECT cDNA サブトラクションキット（クローンテック）を用いて、cDNA合成およびサブトラクションクロニングを行った。CD40刺激によって生じたcDNA断片は直接T/Aベクター（インビトロジェン）に挿入した。得られた塩基配列を比較した結果、ジャーナルオブバイオロジ
10 カルケミストリー（Journal of Biological Chemistry 271, 33376-33381 (1996)）に記載されるCD100遺伝子が単離された。

後述の実施例1、3に記載されるmCD100-FcはマウスCD100に可溶化型ヒトIgG1 Fc部分を融合させた蛋白質である。具体的にはセンス方向のSalI siteを含むプライマー(gctgtcgactgtgtgcccgttgc tgaaggcct)
15 [配列番号：9]とアンチセンス方向のBamHI siteを含むプライマー(gacggatcctacttactttgctttgcttgc tttgagatcacccgtcttctctga) [配列番号：10]の組み合わせからなるオリゴヌクレオチドを用いて、PCR法によりCD40で刺激したWEHI 231細胞から抽出したマウスCD100 cDNAより分泌型マウスCD100 cDNAを調製した。得られたSalI-BamHI断片をp
20 EFBosヒトIgG1 FcカセットのSalI-BamHI断片DNA断片に挿入し、mCD100-Fc蛋白質を発現する遺伝子を作製した。その遺伝子を電気穿孔法(バイオラッドジーンパルサーを用いて、0.25 kV、960 microFDで行う)によりP3U1プラスマサイトーマに導入し形質転換細胞を作製した。具体的には、50 μgのHindIIIで切断したpEFBos-mCD1
25 00-FcプラスミドDNAとBamHIで切断したpMC1neoベクターで10⁷個の細胞を形質転換した。10%の牛胎児血清と0.3 mg/mlのG418を含むRPMI培養液で10日間培養した後、G418に耐性のコロニーを単離してクローン化した。mCD100-Fc蛋白質はプロテインAセファロース（アマーシャムファルマシア）により培養液中より精製した。

後述の実施例1に記載されるビオチン化 mCD100-Fc はビオチン化キット (ベーリンガー・マンハイム) により、mCD100-Fc にビオチンを結合したものである。実施例2に記載されるCD100を発現するCHO細胞に関してはCD100遺伝子がCHO細胞内に導入された形質転換細胞であり、CD100蛋白質を発現する。具体的にはCD100 cDNA全長をpEFBOS vectorに組み込み、pMC1neoベクターと共に、リポフェクタミンプラス(ライフテクノロジー)を用いてCHO細胞に導入した。G418 0.3mg/ml存在下で、10日後、G418耐性の細胞を選択した。

10 参考例2 CD100と結合する分子CD72の単離

C57BL/6マウス由来2B4細胞を10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培養液を用いて培養し、 1×10^6 cells/mlの2B4細胞を2 μ g/mlのconAで18時間刺激した。細胞より全RNAをグアニジンイソチオシアネート密度勾配遠心により単離し、全RNAよりoligo(dT)結合マグネチックビーズ(プロメガ)を用いて、mRNAを選択した。oligo(dT)を含む2本鎖cDNAをSuperScript II cDNA合成キット(ライフテクノロジー)を用いて合成した。そのcDNAにBstXIアダプター(インビトロジェン)を付加し、1%アガロースゲル電気泳動法により分画した。1.0 kb以上のcDNAを回収し、BstXIで切断したpME18Sベクターに挿入した。その挿入したDNAを用いて、電気穿孔法(バイオラッドジーンパルサーを用いて、2.5 kV、25 μ FDで行う)により大腸菌DH10B細胞(ライフテクノロジー)を形質転換した。2 $\times 10^7$ 個の独立したクローンより成る大腸菌より得られたプラスミドを用いて、COS7細胞をリポフェクタミンプラスを用いて形質転換した。形質転換3日後、細胞を回収し、5%牛胎児血清、2.5 μ g/ml Fc block、5 μ g/ml ビオチン化 mCD100-Fcを含むPBSで 5×10^6 cells/mlの濃度に再懸濁し、氷上で1時間静置した。細胞を氷冷PBSで洗浄し、M-280ストレプトアビジンが結合したダイナビーズを含むPBSに懸濁した。懸濁30分後、細胞をMagnetic Particle Concentratorを用いて氷冷PBSで10回洗浄

した。染色体外プラスミドDNAをHirt法(Proceeding of National Academy sciences of USA 84, 3365-3369 (1987))を用いて抽出した。そのプラスミドDNAを大腸菌DH10B細胞に電気穿孔法(バイオラッドジーンパルサーを用いて、2.5 kV、25 μ F Dで行う)で挿入しプロトプラスト融合法により2回目、3回目、4回目の形質転換を行った。上記の磁力による抽出を4回繰り返した。その結果、1.4 kbの明らかなバンドが認められた。この1.4 kbのcDNAクローンについて塩基配列を解析した結果、マウスCD72のcDNA全長[配列番号：6]であった。

実施例1に記載されるCD72を発現するCHO細胞に関してはCD72遺伝子がCHO細胞内に導入された形質転換細胞であり、CD72蛋白質を発現する。具体的にはCD72を組み込んだpME18SベクターをpMC1neoベクターと共に、リポフェクタミンプラス(ライフテクノロジー)を用いてCHO細胞に導入した。G418 0.3 mg/ml存在下で、10日後、G418耐性の細胞を選択した。

実施例1 CD100とCD72との結合

mCD100-Fcはビオチン化キットを用いてビオチン化した。フローサイトメトリーによる解析を行うために、 10^6 個の対照のCHO細胞とCD72を発現するCHO形質転換細胞を5 μ g/mlのFcブロック(ファーマーミンジェン)を含む染色緩衝液(2%牛胎児血清、0.02%アジ化ナトリウム、2 mM塩化カルシウム、1 mM塩化マグネシウムを含むPBS)中で、1時間氷上でビオチン化mCD100-Fc(40 μ g/ml)と反応させた。染色緩衝液で洗浄後、細胞をFITC標識ストレプトアビジン(ベクトンディッキンソン)で20分染色した。細胞を染色緩衝液で洗浄後、フローサイトメーターでFITC標識ストレプトアビジンが結合する細胞を解析した。

図1にその結果を示す。左側の図は対照のCHO細胞、右側の図はCD72を発現しているCHO細胞の結果を示す。点線はmCD100-Fcを添加しなかった場合、実線はmCD100-Fcを添加した場合の結果を示す。図中横軸は1細胞当たりの蛍光強度を、縦軸は細胞数を相対的に示す。左図のCHO細胞で

は、ビオチン化mCD100-Fcを添加しても蛍光強度は変化しなかった。これはCHO細胞がビオチン化mCD100-Fcと結合しないことを示す。右側のCD72を発現するCHO細胞では、ビオチン化mCD100-Fcを添加すると（実線）、添加しない場合（点線）に比べて蛍光強度が強くなった。これはビオチン化mCD100-FcがCD72を発現するCHO細胞表面上のCD72と結合することを示す。

実施例2 マウスCD100のクラススイッチ増強作用

10 1×10^5 cells/well に調製した C57BL/6マウス脾臓由来休止B細胞を抗CD40モノクローナル抗体またはIL-4 100 units/ml とパラホルムアルデヒドで固定したCD100を発現するCHO細胞(2×10^4 cells/well)を共に平底96穴マイクロタイタープレートに添加し、7日間培養した。IgM またはIgG1免疫グロブリンの産生をELISA法により測定した。具体的には、培養液または対照のIgM, IgGを0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)を用いて希釈し、EIA用96穴イムノプレート(マキシソープ:ヌンク社)の各ウェルに100 μ lずつ注入して約4℃で一晩放置して添着した。各ウェルを緩衝液A(0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で洗浄後、緩衝液B(0.1%BSA、0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で希釈した酵素標識した抗IgM, IgG1抗体溶液100 μ lを加えて25℃でさらに約2時間反応させた。各ウェルを緩衝液Aで洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質溶液(1mg/mlフォスファターゼ基質(シグマ)、100mM Tris(pH9.5)、100mM NaCl、5mM MgCl₂)を100 μ l加え25℃で30分間反応させた。マイクロプレート用自動比色計を用い、405nmにおける吸光度を測定した。別に、既知量のIgM, IgG1を添着して、吸光度と抗体量の定量曲線を取ることで、各反応液中の抗体量を定量した。

実験は、(1) CD100非発現CHO細胞非存在下で培養液(Medium)のみ添加した場合、(2) CD100発現CHO細胞存在下で培養液(Medium)のみ添加した場合、(3) CD100発現CHO細胞非存在下で抗CD40抗

体 (α CD40)、IL-4を添加した場合、(4) CD100発現CHO細胞存在下で抗CD40抗体 (α CD40)、IL-4を添加した場合に分けてIgM量、IgG1量を比較した。図2にその結果を示す。横軸は左からそれぞれ(1)、(2)、(3)、(4)の結果を、縦軸は吸光度より定量した抗体量(単位 ng/ml)を示す。

- 5 無添加対照群(1)に比較して、CD100が存在する場合(2)、IgM、IgG1共に抗体産生に影響を及ぼさない。無添加対照群(1)に比べて、抗CD40抗体とIL-4で刺激した場合(3)、IgM、IgG1共に抗体産生を誘導する。CD100存在下で抗CD40抗体とIL-4で刺激した場合(4)、抗CD40抗体とIL-4で刺激した場合に比べて、IgM産生はやや減少気味なのに対して、IgG1産生は(3)に比べてさらに強く上昇した。このことは、
10 B細胞より産生、分泌される抗体のクラスがIgMからIgG1へスイッチされる現象、いわゆるクラススイッチが誘導されたことを示している。

実施例3 CD100の生体内抗体産生増強作用

- 15 100 μ gのアルミで調製したDinitrophenyl ovalbumin (DNP-OVA) をC57BL/6マウス腹腔内に接種し、免疫した。免疫後、ヒトIgG1ミエローマ蛋白質、あるいはmCD100-Fcを200 μ g/day、10日間投与した。DNP-OVA投与6日後、10日後に血清を採集した。DNPに特異的な抗体の抗体価をDNP-BSAを用いたELISA
20 法により測定した。具体的には、免疫後のマウスの血清を0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)を用いて希釈し、DNP-BSAでコートしたEIA用96穴イムノプレート(マキシソープ: ヌンク社)の各ウェルに100 μ lずつ注入して4℃で一晩放置して添着した。各ウェルを緩衝液A(0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で洗浄後、緩衝液B(25%ブロッケー
25 (大日本製薬)、0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で希釈したアルカリフォスファターゼで標識した抗マウスIgM、IgG1、抗体溶液100 μ lを加えて25℃でさらに2時間反応させ、ウェルに添着している抗DNP抗体に結合させた。各ウェルを緩衝液Aで洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質溶液を100 μ l加え25℃で30分間反応させ、マイクロプレ

ート用自動比色計を用い405nmにおける吸光度を測定した。DNP特異的抗体を定量した。

図3にその結果を示す。左側の図はDNP-OVA投与6日後、右側の図は10日後の血清中に含まれるDNPに対する抗体価を示す。横軸の□はヒト IgG 1 ミエローマ蛋白質を、□は mCD100-Fc を投与した場合の抗体価を示す。縦軸Anti-DNPはDNPに対する抗体価を示す。投与12日後の対照群のマウスの血清中に含まれるDNPに対する抗体量の1000分の1を1 unit とした。CD100 (mCD100-Fc) を投与した場合、6日目の抗体価は、対照のヒト IgG 1 ミエローマ蛋白質を投与した場合の6日目の抗体価を3倍以上上回るものであり、対照のヒト IgG 1 ミエローマ蛋白質を投与した場合の10日目の抗体価を上回るものであった。このことから、CD100は抗原特異的な抗体産生の誘導能に重要な働きがあることを示している。

実施例4 CD100ノックアウトマウスの作出

CD100 cDNA配列に由来する2種類のプローブ(全長および1-1200bpまで)を用いて129/SvJマウス肝臓由来ゲノムライブラリー(ストラテジーン)から約12kbのCD100ゲノムDNA断片を含むファージクローンを単離した。このDNA断片内で、開始コドンが存在する第1エクソンの一部を含む1.6Kb部分をネオマイシン耐性遺伝子(母子保健センターより分与)と置き換えた(セル(Cell)51巻(1987年)503-512頁)。さらに、ヘルペスシンプレックスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK)をネガティブ選択のためにCD100ゲノム遺伝子下流に挿入し(ネイチャー(Nature)336巻(1988年)348-352頁)、ターゲッティングプラスミドDNAを構築した。このターゲッティングプラスミドDNA50μgを電気穿孔法により 1×10^6 個のE14-1胚幹細胞内に形質導入した。遺伝子を導入した胚幹細胞について、G418(0.4mg/ml; ライフテクノロジー)およびガンシクロビル(2μM; シンテックス社)による二重選択を行った。1000個の耐性コロニーからCD100遺伝子上に相同組み換えが生じているものをサザンブロット法により選択した結果、相同組み換えが生じている

2 クローンの胚幹細胞を同定した。

CD100 変異クローン由来の胚幹細胞をC57BL/6 マウス（静岡実験動物協会、6-8 週齢）の胚盤胞に接種した後、ICR 仮親（静岡実験動物協会、6-8 週齢）に移した。毛並みのアグーチ色の度合いで子のキメリズムを判定し、雄キメラをさらにC57BL/6 雌マウスと交配させたノックアウトマウスを作出した。産出された子について、CD100 遺伝子がノックアウトしているかどうかをサザンブロット法により解析した。マウス尻尾よりゲノムDNAを単離、BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行った。泳動したDNAはナイロンフィルター（アマシャムファルマシア）に転写した後、放射標識したプローブ（CD100 プロモーター領域、0.2 Kb）と一晚ハイブリダイズした。フィルターは0.1xSSC, 0.1%SDS中、65℃で1時間洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。

図4にその結果を示す。Aは上からそれぞれCD100 野生型遺伝子、CD100 ターゲティングベクターの遺伝子地図、予想される組み換えが起こった場合のCD100 遺伝子地図を示す。5' 非翻訳領域のエクソンを灰色枠で、翻訳領域のエクソンを黒枠で示す。BはBamHI 制限酵素で切断を受ける位置、EはEcoRI 制限酵素で切断を受ける位置を示す。Neoはネオマイシン耐性遺伝子をHSV-TKはヘルペスシンプレックスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を矢印はこれらの遺伝子の転写方向を表す。プローブはサザンブロットで用いたプローブの位置を示す。BamHI 切断によるサザンブロットを行った場合、プローブに結合する遺伝子長は野生型遺伝子では2.6 Kb、組み換え体では1.2 Kbが予定される。

Bは野生型 (+/+), ヘテロ接合体 (+/-), 変異遺伝子のホモ接合体 (-/-) 遺伝子型をサザンブロット法で解析した結果を示す。野生型では2.6 Kbの断片のみ、ヘテロ接合体では2.6 Kbと1.2 Kbの2種類の断片、変異遺伝子のホモ接合体では1.2 Kbの断片のみが認められた。プローブに結合する遺伝子長は野生型遺伝子では2.6 Kb、組み換え体では1.2 Kbが予定されたので、作出したマウスがCD100 遺伝子座が予想される長さに置き換えられたノックアウトマウスであることを示す。

CはノックアウトマウスがCD100分子を細胞上に発現していないことを確認した結果を示す。野性型マウス（+/+）および、CD100ノックアウトマウス（-/-）より調製した脾臓細胞をビオチン化抗マウスCD100抗体/FITC標識ストレプトアビジンおよびフィコエリスリン標識抗B220（マウスB細胞の細胞表面マーカー）抗体で二重染色した後、フローサイトメトリーで解析した結果を示す。図中縦軸、横軸はそれぞれ、B220、CD100分子の細胞表面上の産生量について、細胞当りの蛍光強度として対数表示で示す。野性型マウスではCD100陽性細胞が認められるのに対して、ノックアウトマウスではCD100陽性細胞が認められなかった。したがって、ノックアウトマウスではCD100分子が細胞上に発現されていないことが確認された。

実施例5 ノックアウトマウスおよび野性型マウスリンパ球のCD5表面抗原に関する解析

腹腔細胞は2%FCS、10U/mlヘパリンを含むリン酸緩衝液で腹腔を洗い採集した。腹腔または脾臓より調製した細胞懸濁液をFITC標識抗B220抗体およびフィコエリスリン標識抗CD5抗体（各ファーマーミンジェン）により二重染色した後解析した結果を示す。B220はマウスB細胞の細胞表面マーカーである。CD5は自己抗体産生に関するマーカーとして知られている（オートイミュニティ、30巻（1999年）63-69頁）。

結果を図5に示す。+/+は野性型マウス、-/-はCD100ノックアウトマウスを示す。図中横軸、縦軸はそれぞれ、B220、CD5分子の細胞表面上の産生量について、細胞当りの蛍光強度として対数表示で示す。両細胞マーカー陽性細胞分画を図中枠線内で示す。腹腔細胞の場合、B220、CD5両陽性細胞の割合は野性型マウスでは14.6%であったのに対してノックアウトマウスでは7.49%で減少していた。脾臓細胞の場合、B220、CD5両陽性細胞の割合は野性型マウスでは1.5%であったのに対してノックアウトマウスでは0.93%でこちらも減少していた。これらの結果はCD100がCD5分子発現に寄与していることを示唆している。したがって、CD100の機能を阻害することができれば、自己免疫疾患の際に発現が増強されるとされるCD5を抑え

自己免疫疾患の治療に役立つ可能性がある」と推定される。

実施例6 TD (T細胞依存性) 抗原に対する抗体産生

8週齢のCD100ノックアウトマウスおよび野性型マウス($n=4$ または5)を100 μ gのNP-CGG (4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチルチキanganマグロブリン標識体)を含むアルミニウム塩で2回(2回目は28日後)腹腔内に免疫した($n=5$)。採血は免疫前と免疫後14, 21, 28, 35, 72日目に行った。NP₁₂ 標識ウシ血清アルブミン(12個の4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル基が標識されたBSA)およびNP₂ 標識ウシ血清アルブミンでコートされたプレートを用いることによりNP(ニトロフェニル基)に結合性の全IgGおよび、その中でも高親和性に結合するIgGをそれぞれELISA法により定量した。96穴マイクロプレート(ヌンク)にNP₁₂ 標識ウシ血清アルブミンまたはNP₂ 標識ウシ血清アルブミンを一晩4℃でコートした。洗浄後、200 μ l/穴のブロッキング溶液(50mM Tris-HCl (pH8.1), 1mM MgCl₂, 0.15M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween20)を加え、室温で1時間静置した。ブロッキング溶液で希釈した100 μ l/穴の検体を室温で1.5時間静置した。0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG1抗体を添加した。1時間後、洗浄し、フォスファターゼ基質(シグマ)を添加し405nmの吸光度で検出した。

結果を図6に示す。AはNP₁₂ 標識ウシ血清アルブミン結合性のIgG量の経時的变化を示す。BはNP₂ 標識ウシ血清アルブミン結合性のIgG量の経時的变化を示す。CはNP₂ 標識ウシ血清アルブミン結合性のIgG量とNP₁₂ 標識ウシ血清アルブミン結合性のIgG量との比を経時的に示す。縦軸はA, Bでは抗体量を示す。Cではそれらの比として示す。横軸は初回免疫日を0日として免疫後の経過日数を示す。○はCD100ノックアウトマウスを△は野性型マウスを用いた場合の結果を示す。

図6A, 6Bに示すとおりノックアウトマウスでは野性型マウスと比較して産生抗体量は減少しており、CD100ノックアウトマウスではTD (T細胞依存

性) 抗原に対する抗体産生能が損なわれていることが認められた。特に高親和性抗体の方が低親和性抗体と比較して大きく産生量が低下していた。図6Cに示すとおり野性型マウスでは経時的に NP_2/NP_{12} 比が増加した。これは時間経過と共に高親和性の抗体を産生するB細胞群に成熟している過程を示すが、ノックアウトマウスでは NP_2/NP_{12} 比の増加は野性型マウスと比較して緩やかであり、高親和性抗体産生への成熟化の機構が損なわれていることが示された。TD (T細胞依存性) 抗原に対する抗体産生能つまりTD反応の低下は、感染症などに対する抵抗性が弱くなることが知られている (イミュノデフェンションレビュー、3巻: (1988年) 101-121頁)。したがって、CD100の投与またはCD100の作用を増強させる物質は感染症などに対する新たな治療薬となる可能性がある。

実施例7 CD100ノックアウトマウスにおけるT細胞の反応性の喪失

8週齢の野性型マウスおよびCD100ノックアウトマウスに完全フロインドアジュバントに懸濁したKLH (キーホールリンペットヘモシアニン) をT細胞を脾臓より採集する場合は腹腔内に、所属リンパ節より採集する場合はフットパッドに免疫した。免疫9日後、CD4陽性T細胞をCD4標識マグネットビーズ (Magnetic Cell Sorting、ミルテンイバイオテック) により脾臓または所属リンパ節より調製した。 1×10^5 個の細胞を、放射線処理 (3000 rad) した野性型マウス脾臓細胞 (5×10^5) 存在下、種々の濃度のKLHで3日間刺激した。細胞増殖性を検討する場合、 $2 \mu Ci$ のトリチウムチミジンを12時間添加し、細胞内の放射活性を測定した。3日間の細胞培養上清中のIL-4 (インターロイキン4) およびIFN- γ (インターフェロンガンマ) 量はELISAキット (R&Dシステム) により測定した。

結果を図7に示す。Aは脾臓由来CD4陽性T細胞のKLH刺激による増殖性の野性型マウスとCD100ノックアウトマウスでの比較を示す。Bは所属リンパ節由来CD4陽性T細胞のKLH刺激による増殖性の野性型マウスとCD100ノックアウトマウスでの比較を示す。○は野性型マウス、△はCD100ノックアウトマウスの結果を示す。縦軸は細胞内放射活性を増殖性の指標として表す。

5 横軸は添加したKLH量を示す。Cは 所属リンパ節由来CD4陽性T細胞のKLH刺激による増殖性、IL-4およびINF- γ 産生能の野性型マウスとCD100ノックアウトマウスでの比較および、CD100添加による影響について示す。mCD100-Fcは免疫翌日より連続6日間、50 μ g/mouseを静脈内に投与した。4 μ g/mlのKLHを用いた場合の結果を示す。横軸+/+、-/-は野性型マウス、ノックアウトマウスを示す。CD100-Fcは+が添加した場合、-が添加しなかった場合を示す。縦軸は左より増殖性、IL-4量、INF量を表す。

10 図7Aに示すとおり脾臓由来T細胞のKLHに対する反応性はノックアウトマウスにおいて野性型マウスと比較して低下した。図7Bに示すとおり、リンパ節由来のT細胞ではさらに反応性の低下がノックアウトマウスで認められ、KLH量を増加させても反応性が認められなかった。図7Cに示すとおり、ノックアウトマウスにおいて、CD4陽性T細胞のIL-4およびINF- γ の産生能は野性型マウスに比べて著しく低下し、両因子はほとんど産生されていないことが認められた。さらに、可溶性CD100を加えることによって反応性の低下は回復し、ノックアウトマウスにおけるこれらの異常はCD100を介したものであることが確認された。

20 抗原提示細胞が活性化されることにより、抗腫瘍性T細胞の活性化が誘導され、抗腫瘍免疫が生じることが報告されている。その際、抗腫瘍性T細胞では増殖性の上昇、IL-4およびINF- γ の産生能の亢進が認められる。本実施例の結果より、抗原特異的なT細胞の活性化についてノックアウトマウスでは増殖性、IL-4産生能、INF- γ 産生能いずれの指標からも大きく低下した。これは、CD100が抗腫瘍性T細胞の活性化に深く関与していることを示唆している。実際、抗原提示細胞上または活性化T細胞上にはCD100の受容体であるCD
25 72が発現している（アニュアルソーラシックサージェリー、61巻：（1996年）252—258頁）。したがって、CD100はこれらの細胞に直接働いて、T細胞を活性化し、抗腫瘍活性を発揮できるものと推測される。

実施例8 MRL/lpr自己免疫疾患モデルマウス血清中に含まれる可溶性C

D100および抗単鎖DNA抗体量の検討

C57BL/6、Balb/c、MRL/n、MRL/lprマウスはSLC（静岡実験動物協同組合）より購入した。採血は16週齢のマウスより眼底から採集した。可溶性CD100とFlagとのマウス融合蛋白質は抗CD40抗体で刺激したWEHI-231細胞から調製したCD100 cDNAよりPCR法により作製した。プライマーは5'端の配列としてSalI部位を含む5-gctgtcgactgtgtgccgttgctgaaggcct〔配列番号：9〕を3'端の配列としてBamHI部位、Flag配列を含む5-gacggatcctacttactttgctttgcttgcttgagatacacggtcttctctga〔配列番号：10〕を用いた。PCRで生じたSalI-BamHI断片をpEFBos human IgG1 Fc カセットのSalI-BamHI部分に組み込んだ。10⁷個のP3U1形質細胞腫にHindIIIで切断した50mgのCD100-FlagプラスミドDNAとBamHIで切断した5mgのpMC1neoベクターを電気穿孔法により導入した。遺伝子が導入された細胞を10%の牛胎児血清および0.3mg/mlのG418を含むRPMI 1640培養液で選択した。CD100-Flag蛋白質は抗Flag抗体標識アガロース（シグマ）を用いて精製した。

可溶性CD100を検出するためのサンドイッチELISA法は次の通りに行った。96穴マイクロプレート（ヌンク）にラット抗マウスCD100抗体（クローンBMA-12、5μg/ml）を一晩4℃でコートした。洗浄後、200μl/穴のブロッキング溶液（50mM Tris-HCl（pH8.1）、1mM MgCl₂、0.15M NaCl、1% BSA、0.05% Tween 20）を加え、室温で1時間静置した。ブロッキング溶液で希釈した100μl/穴の検体および標準試料（可溶性CD100とFlagとのマウス融合蛋白質）を室温で1.5時間静置した。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、2μg/mlのビオチン化ラット抗マウスCD100抗体（クローンBMA-8）を添加した。1時間後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン（シグマ）を添加し、洗浄後、フォスファターゼ基質（シグマ）を添加し可溶性CD100分子を405nmの吸光度で検出した。抗単鎖DNAは以下のように調製した。ウシ胸腺DNA（シグマ）をS1ヌクレアーゼ（シグマ）で

処理し二重鎖DNAを得た。二重鎖DNAを15分煮沸後、氷冷することにより単鎖DNAを得た。5 μ g/mlの単鎖DNAを96穴マイクロプレートに添着し、マウス血清を添加し、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体(サザンバイオテクノロジー)を添加した。なお、モノクローナル抗体BMA-8、
 5 BMA-12の作製は以下の通りに行った。100 μ gのCD100-Fcを皮下に、一週間毎に計4回投与し、免疫した。免疫に用いたアジュバントは1回目はフロイント完全アジュバントを2回目以降はフロイント不完全アジュバントを用いた。さらにラット屠殺五日前に同じ量を静脈内に投与した。ラット脾臓よりB細胞を調製し、ミエローマ細胞と融合させた。融合細胞よりCD100に対する
 10 抗体を産生するクローンBMA-8、BMA-12を選択した。クローンをラット腹腔内に移植し、腹水中より抗体を精製した。

結果を表1に示す。

〔表1〕

15	可溶性CD100 (ng/ml)	単鎖DNA (吸光度)
C57BL/6 (n=7)	<12	-
Balb/c (n=8)	<12	-
MRL/n (n=10)	<12	0.005
MRL/lpr (n=20)	166 \pm 172	0.184 \pm 0.063

20 表1にはマウス系統と可溶性CD100量、単鎖DNA量との関係を示す。MRL/lprマウスはMRL/nマウスより選抜された自己免疫疾患モデルマウスである。血清中に含まれる可溶性CD100量はC57BL/6、Balb/c、MRL/n正常マウスでは検出限界(12 ng/ml)以下であったが、自己免疫疾患様症状を示すMRL/lpr自己免疫疾患マウスでは非常に上昇して
 25 いた(166 ng/ml)。同様に、自己免疫疾患に伴う自己抗体量の指標となる抗単鎖DNA抗体量はMRL/lprマウスではMRL/nマウスに比べて非常に増加しており、MRL/lprマウスが自己免疫疾患様の症状を呈していることが、抗単鎖DNA抗体量からも明らかであった。これらの結果より、MRL/lpr自己免疫疾患マウスにおいては、CD100の産生異常が関与している可

能性が高く、CD100の阻害剤が慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患に有効であることが動物実験から示された。

実施例9 MRL/lprマウスにおける加齢に伴う可溶性CD100および自己抗体量の増加

8-20週齢のマウスを用いて可溶性CD100量(A)と抗単鎖DNA抗体量(B)を測定した。採血は眼底から採集した。可溶性CD100を検出するためのサンドイッチELISA法は次の通りに行った。96穴マイクロプレート(ヌンク)にラット抗マウスCD100抗体(BMA-12、 $5\mu\text{g/ml}$)を一晩4℃でコートした。洗浄後、 $200\mu\text{l}$ /穴のブロッキング溶液(50mM Tris-HCl (pH8.1)、 1mM MgCl_2 、 0.15M NaCl、 1% BSA、 0.05% Tween20)を加え、室温で1時間静置した。ブロッキング溶液で希釈した $100\mu\text{l}$ /穴の検体および標準試料(可溶性CD100とFLAG配列とのマウス融合蛋白質)を室温で1.5時間静置した。 0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄後、 $2\mu\text{g/ml}$ のビオチン化ラット抗マウスCD100抗体(BMA-8)を添加した。1時間後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン(シグマ)を添加し、洗浄後、フォスファターゼ基質(シグマ)を添加し可溶性CD100分子を 405nm の吸光度で検出した。抗単鎖DNAは以下のように調製した。ウシ胸腺DNA(シグマ)をS1ヌクレアーゼ(シグマ)で処理し二重鎖DNAを得た。二重鎖DNAを15分煮沸後、氷冷することにより単鎖DNAを得た。 $5\mu\text{g/ml}$ の単鎖DNAを96穴マイクロプレートに添着し、マウス血清を添加し、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体(サザンバイオテクノロジー)を添加した。

結果を図8に示す。Aは血清中の可溶性CD100量を、Bは血清中の抗単鎖DNA抗体量を示す。横軸はマウスの週齢を表す。Bの縦軸は抗体量を表す。2週齢のマウスの血清から得られた数値を1として、各検体の数値がどの程度の倍率になったかで表示した。血清中の可溶性CD100量は8週齢のMRL/lprマウスでは検出感度以下であったが、週齢とともに上昇し、16週齢では $116 \pm 89\text{ng/ml}$ に達した。同様に、自己免疫疾患の病状進行の指標となる

抗単鎖DNA抗体量も週齢とともに上昇した。これらの結果より血清中の可溶性CD100量の上昇はMRL/lprマウスにおける自己免疫疾患の進行状況と経時的に相関することが判明した。この結果からも、MRL/lpr自己免疫疾患マウスにおいては、CD100の産生異常が関与している可能性が高く、CD100の阻害剤が慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患に有効であることが示された。

実施例10 CD100ノックアウトマウスにおける樹状細胞の反応性の喪失

8週齢の野性型マウスおよびCD100ノックアウトマウスより骨髓細胞を採集した。骨髓細胞をGM-CSFの存在下で6日間培養することにより樹状細胞を調製した。96穴プレートに 2×10^5 個/穴の樹状細胞を播種し、抗マウスCD40抗体(HM-40-3(ファージン)、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$)またはLPS(リポポリサッカライド、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し、72時間培養した。培養上清中のIL-12量をELISAキット(アマシャムファルマシア)により測定した。

結果を図9に示す。野性型マウスの結果を白で、ノックアウトマスの結果を斜線で表す。IL-12量を縦軸に表す。野性型マウス由来の樹状細胞に抗CD40抗体またはLPSで刺激をかけた場合、IL-12産生量は上昇し、樹状細胞は活性化された。しかし、ノックアウトマウス由来の樹状細胞を用いた場合、IL-12産生量は減少し、樹状細胞の活性化は損なわれた。抗原提示細胞が活性化されるIL-12が放出されることにより、抗腫瘍性T細胞の活性化が誘導され、抗腫瘍免疫が生じることが報告されている(ネイチャー、393巻:(1998年)413-414頁)。本実施例の結果より、樹状細胞の活性化についてノックアウトマウスでは大きく低下した。これは、CD100が樹状細胞の活性化に深く関与していることを示唆している。したがって、CD100は樹状細胞を活性化し、抗腫瘍活性を発揮できるものと推測される。

実施例11 CD100トランスジェニックマウスにおけるT細胞の反応性亢進 B細胞特異的にマウスCD100を発現させるため、イミュノグロブリンV領

域重鎖遺伝子プロモーター、イミュノグロブリン重鎖遺伝子イントロンエンハンサーおよびイミュノグロブリン κ 鎖エンハンサーよりなるE μ ベクターに全長あるいは細胞内領域を欠失させた膜型マウスCD100 cDNAを組み込んだコンストラクトを作製した。この遺伝子断片をC57BL/6マウスの受精卵に導入することによりトランスジェニックマウスを作製した。

8週齢の野性型マウスおよびCD100ノックアウトマウスに完全フロインドアジュバントに懸濁したKLH（キーホールリンペットヘモシアニン、10 μ g/マウス）を腹腔内に免疫した。免疫9日後、CD4陽性T細胞をCD4標識マグネットビーズ（Magnetic Cell Sorting、ミルテンイバイオテック）により所属リンパ節より調製した。1 \times 10⁵個の細胞を、放射線処理（3000rad）した野性型マウス脾臓細胞（5 \times 10⁵）存在下、種々の濃度のKLHで3日間刺激した。細胞増殖性を検討する場合、2 μ Ciのトリチウムチミジンを12時間添加し、細胞内の放射活性を測定した。3日間の細胞培養上清中のIFN- γ （インターフェロンガンマ）量はELISAキット（R&Dシステム）により測定した。

結果を図10に示す。左図はIFN- γ 産生量、右図は増殖性を示す。○は野性型マウス、●はCD100トランスジェニックマウスの結果を示す。横軸は添加したKLH量を示す。増殖性は細胞内放射活性を指標として表す。

図10に示すとおり、トランスジェニックマウスにおいて、CD4陽性T細胞のIFN- γ 産生量および増殖性は野性型マウスに比べて上昇した。これはKLHに特異的なT細胞が活性化されたことを示す。抗原提示細胞が活性化されることにより、抗腫瘍性T細胞の活性化が誘導され、抗腫瘍免疫が生じることが報告されている（ネイチャー、393巻：（1998年）413-414頁）。その際、抗腫瘍性T細胞では増殖性の上昇およびIFN- γ の産生能の亢進が認められる。本実施例の結果より、抗原特異的なT細胞の活性化についてトランスジェニックマウスではIFN- γ 産生量および増殖性のいずれの指標も上昇した。これは、CD100が抗腫瘍性T細胞の活性化に深く関与していることを示唆している。実際、抗原提示細胞上または活性化T細胞上にはCD100の受容体であるCD72が発現している（アニュアルソーラシックサージェリー、61巻：（199

6年) 252-258頁)。したがって、CD100はこれらの細胞に直接働いて、T細胞を活性化し、抗腫瘍活性を発揮できるものと推測される。また、このトランスジェニックモデルマウスはCD100産生亢進による免疫反応過敏な状態にあると考えられる。したがって、CD100亢進によって生じる推定される免疫不全症などの疾患のモデルになると考えられる。

産業上の利用可能性

本発明のCD72またはその塩およびCD100またはその塩を用いることを特徴とするCD72またはその塩とCD100またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、ウイルスによる感染症または疾病（かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、带状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人T細胞白血病（ATL）、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど）、細菌または真菌による感染症または疾病（細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兔病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など）、癌（口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など）などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アゴニスト、異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病（アトピー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支炎、肺アスペルギルス症、寄生虫疾患、木村氏病、高IgE症候群、Wiskott-Aldrich症候群、胸腺形成不全症、Hodkin病、肝硬変、急性肝炎、慢性関節リウマチ、インシュリン依存性糖尿病、全身性エリトマトーデス、強皮症、不妊症、子宮内膜症、自己免疫性甲状腺疾患重症筋無力症、橋本病、Basedow病、悪性貧血、Addison病、男性不妊症、多発性硬化

- 症、Goodpasture症候群、天疱瘡、類天疱瘡、重症筋無力症、水晶体性眼炎、交感性眼炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、自己免疫性白血球減少症、Felty症候群、自己免疫性リンパ球減少症、潰瘍性大腸炎、Sjogren症候群、全身性自己免疫疾患、原発性胆汁性肝硬変症、ルポイド肝炎など) などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。
- 5

請求の範囲

1. CD100またはその塩およびCD72またはその塩を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法。
5
2. CD100またはその塩およびCD72またはその塩を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
10
3. 請求項1記載のスクリーニング法または請求項2記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
4. CD100またはその塩の活性を促進または阻害する請求項3記載の化合物またはその塩。
15
5. 請求項3記載の化合物またはその塩を含有する医薬。
6. 抗体産生誘導剤、または抗体異常産生に起因する疾患の予防・治療剤である請求項5記載の医薬。
20
7. 抗体異常産生に起因する疾患がアレルギーまたは自己免疫疾患である請求項6記載の医薬。
25
8. CD100またはその塩、あるいはCD100またはその塩および試験化合物をCD72の発現細胞に添加し、発現細胞より産生もしくは分泌された抗体量の変化を測定することを特徴とする請求項1記載のスクリーニング法。

9. T細胞の反応性が喪失した、CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物。

10. CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いることを特徴とするCD100の欠損に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング法。

11. CD100遺伝子がノックアウトされた非ヒト動物を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法。

10

12. 受容体がCD72またはその塩である請求項11記載のスクリーニング法。

15

13. 外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有することを特徴とするT細胞の反応性が亢進したトランスジェニック非ヒト動物または該DNAを有するその子孫。

20

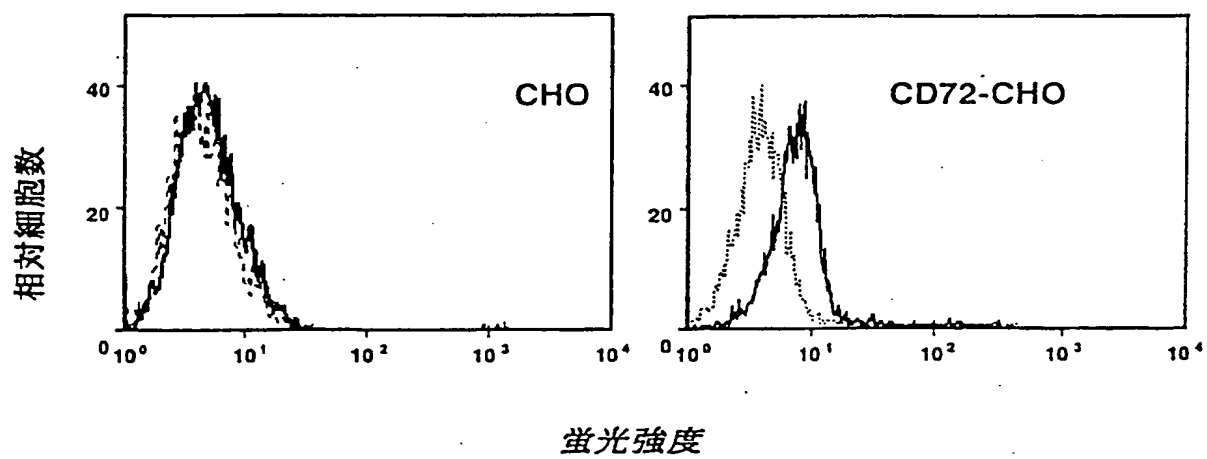
14. 外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物または該DNAを有するその子孫を用いることを特徴とするCD100の亢進に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング法。

25

15. 外来性CD100遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト動物または該DNAを有するその子孫を用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法。

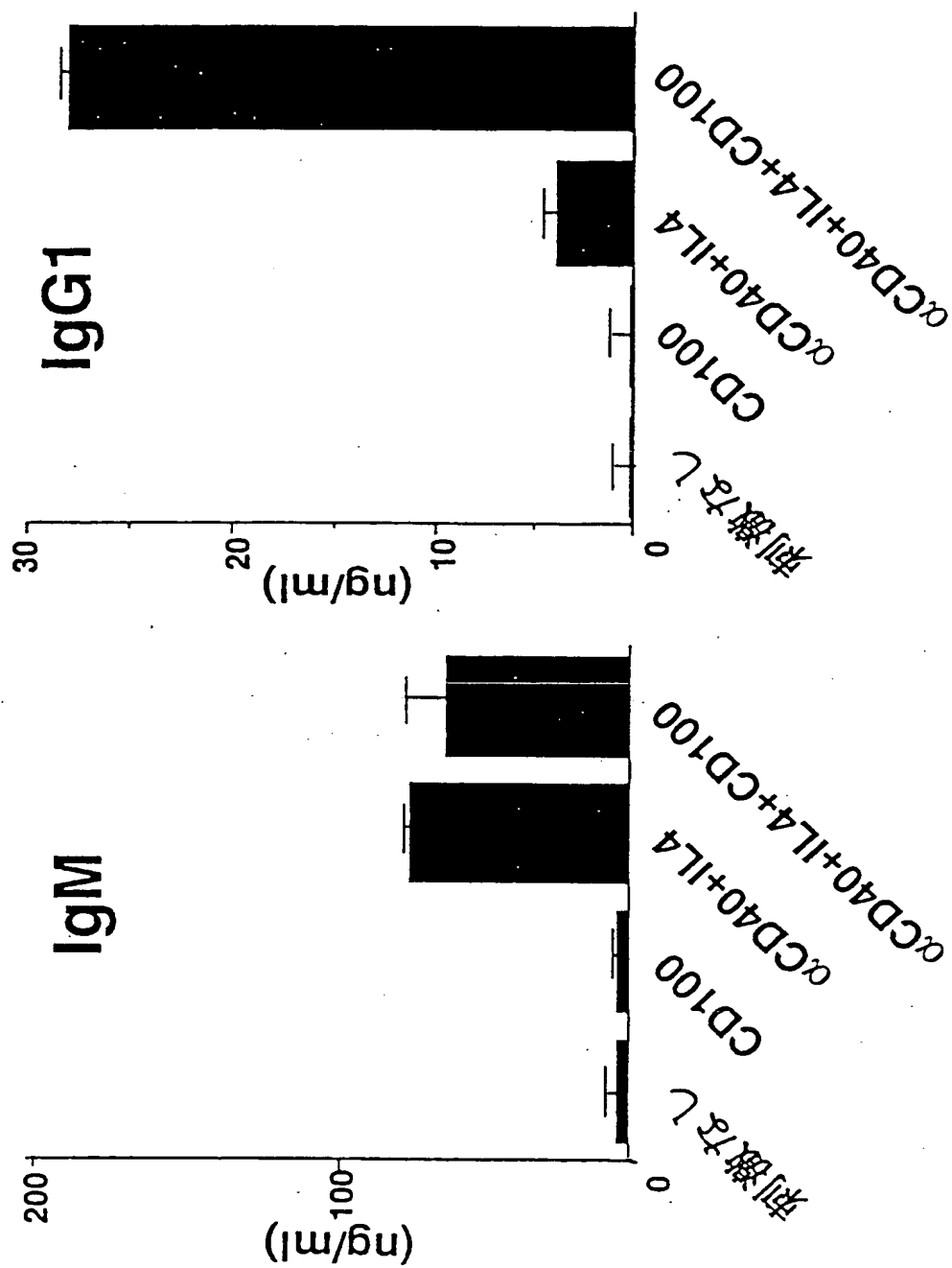
16. 受容体がCD72またはその塩である請求項15記載のスクリーニング法。

図 1



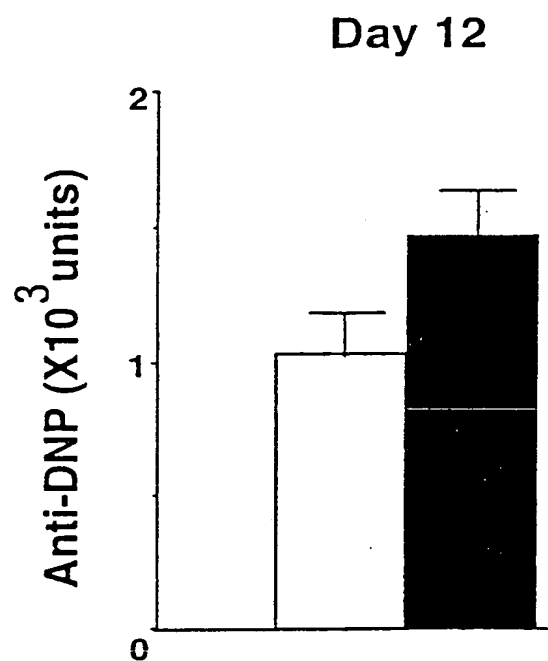
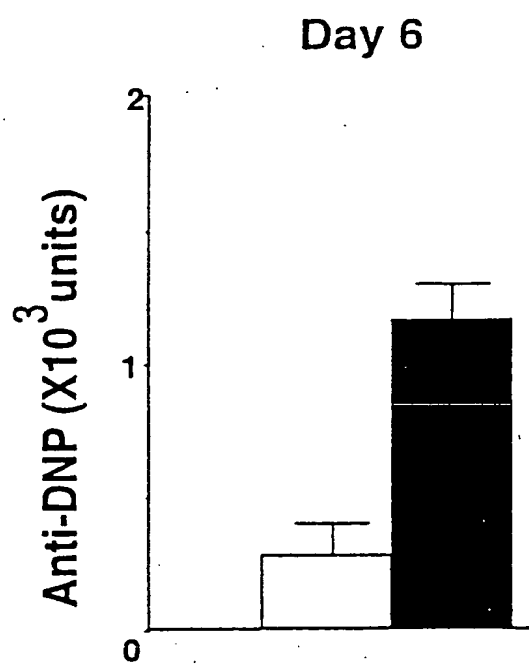
2/10

図 2



3/10

Figure 3





4/10

図 4

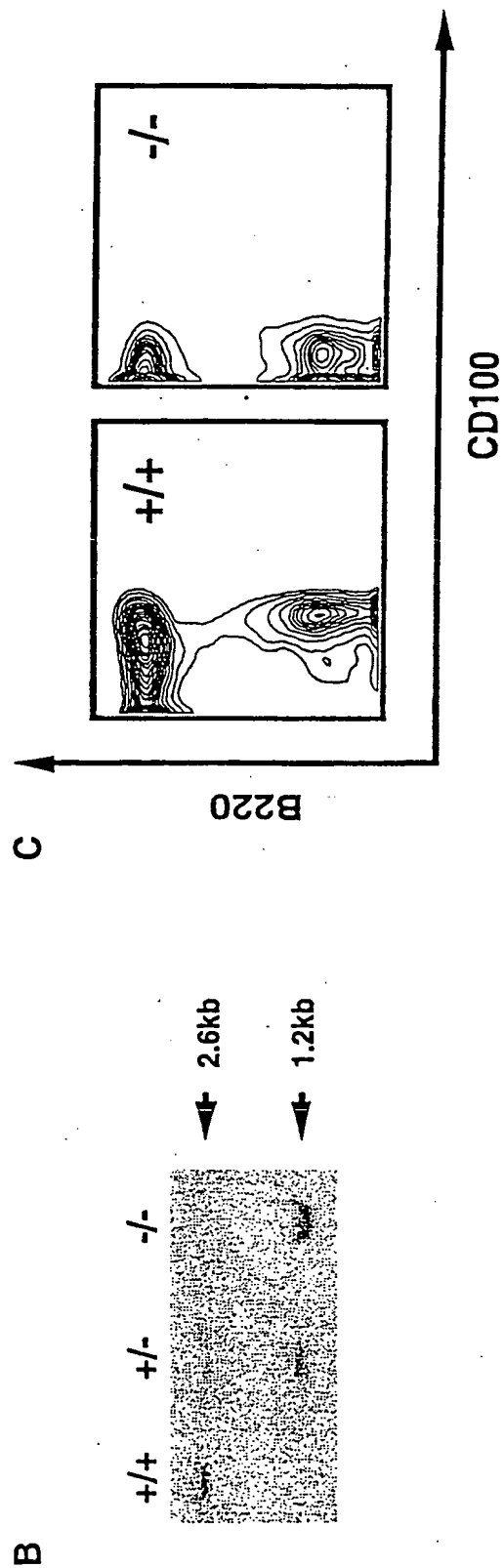
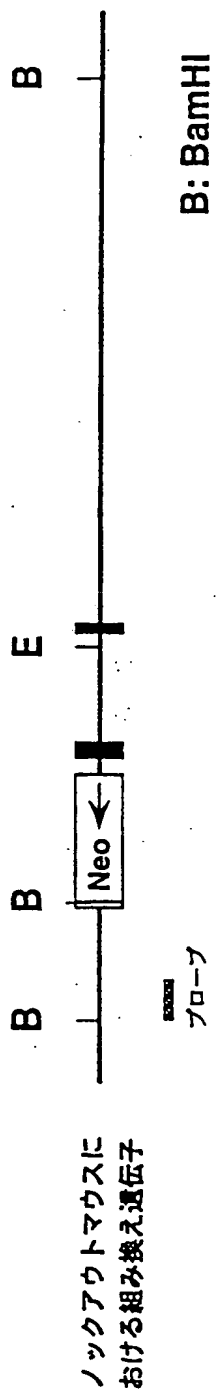
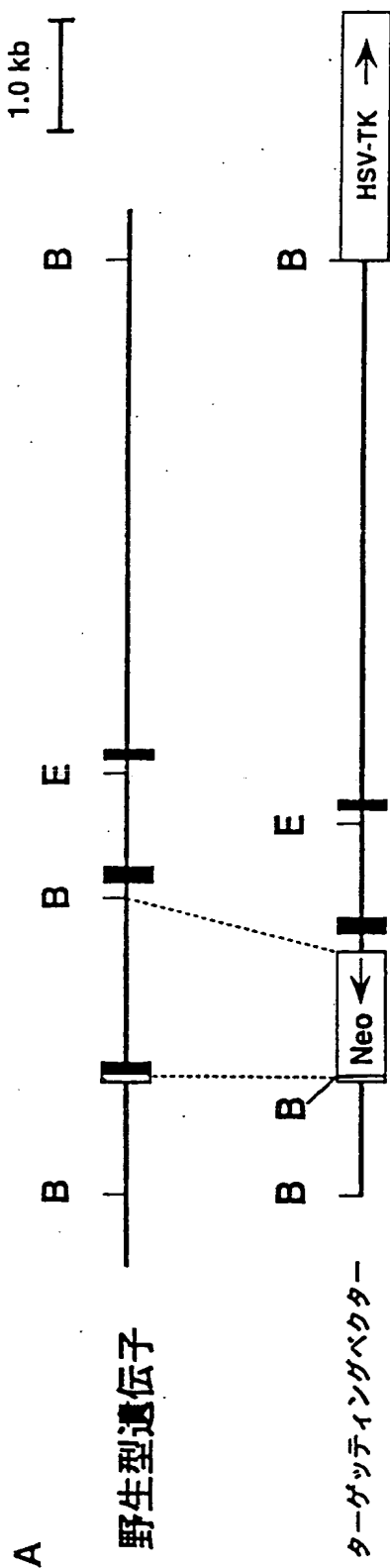
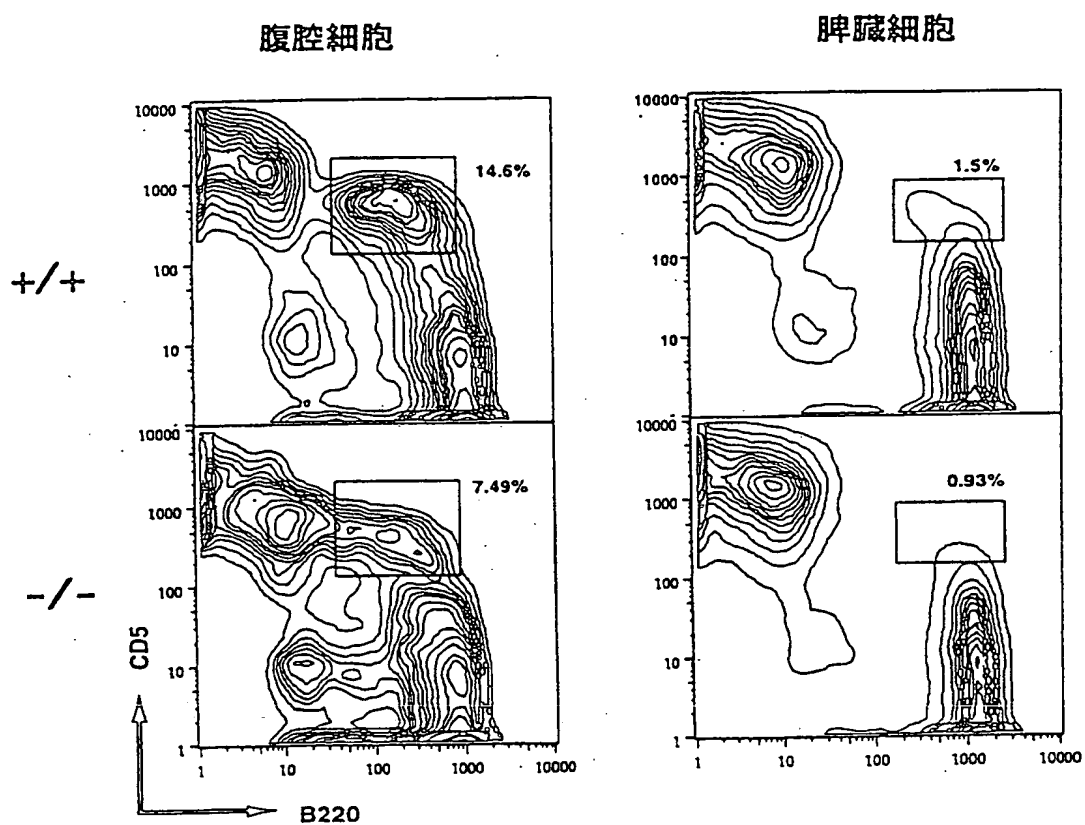


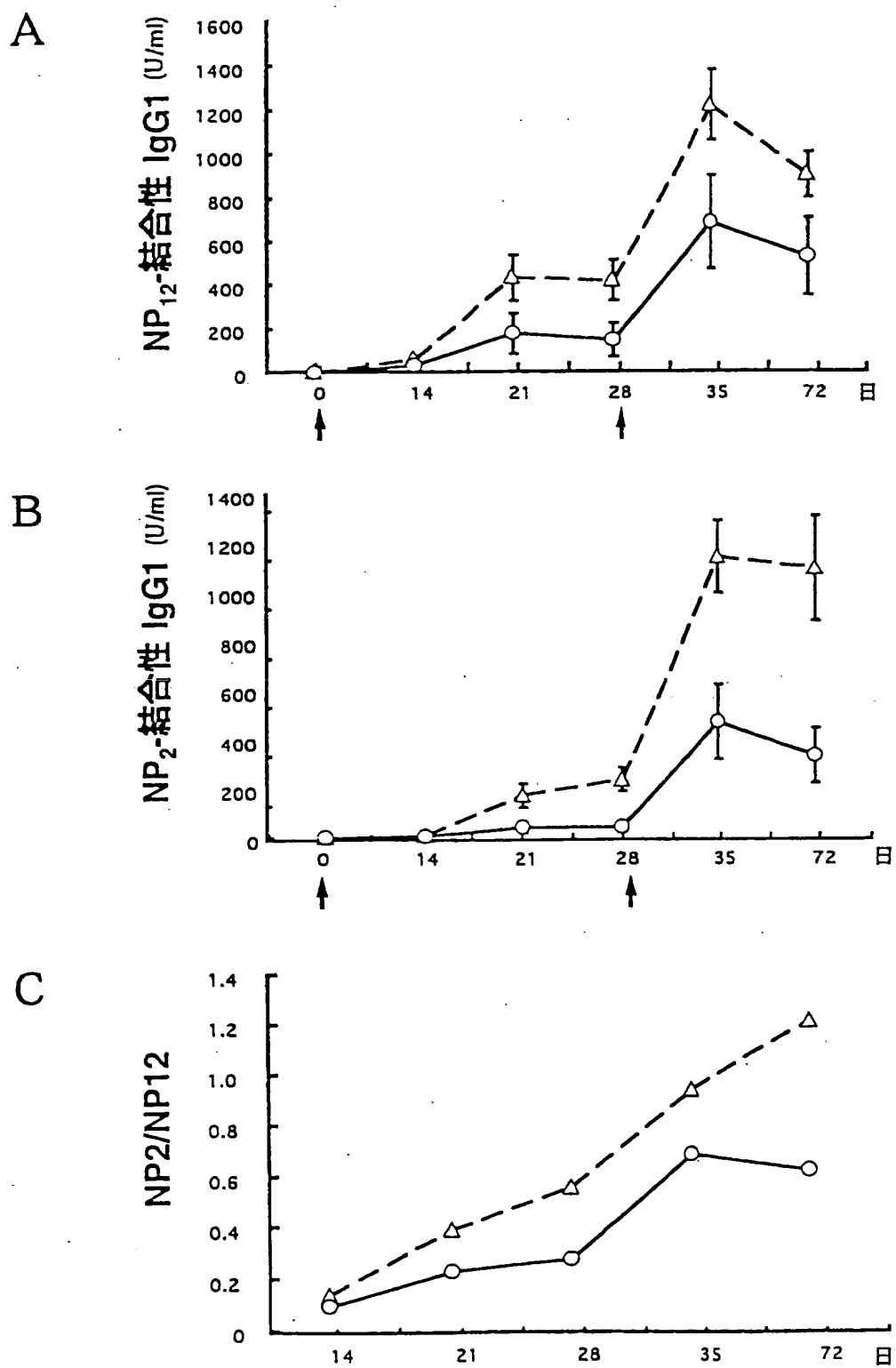
図 5





6/10

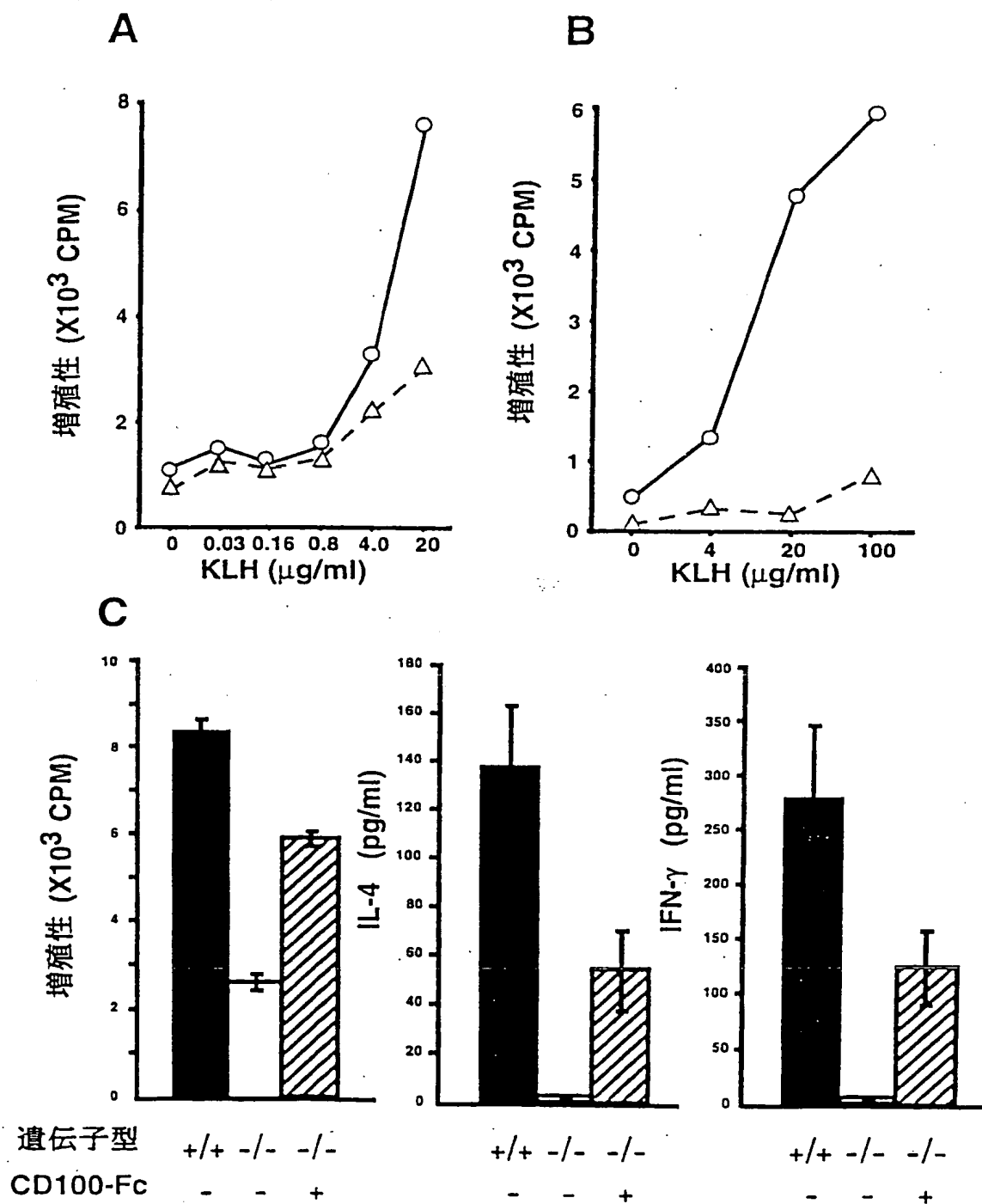
図 6





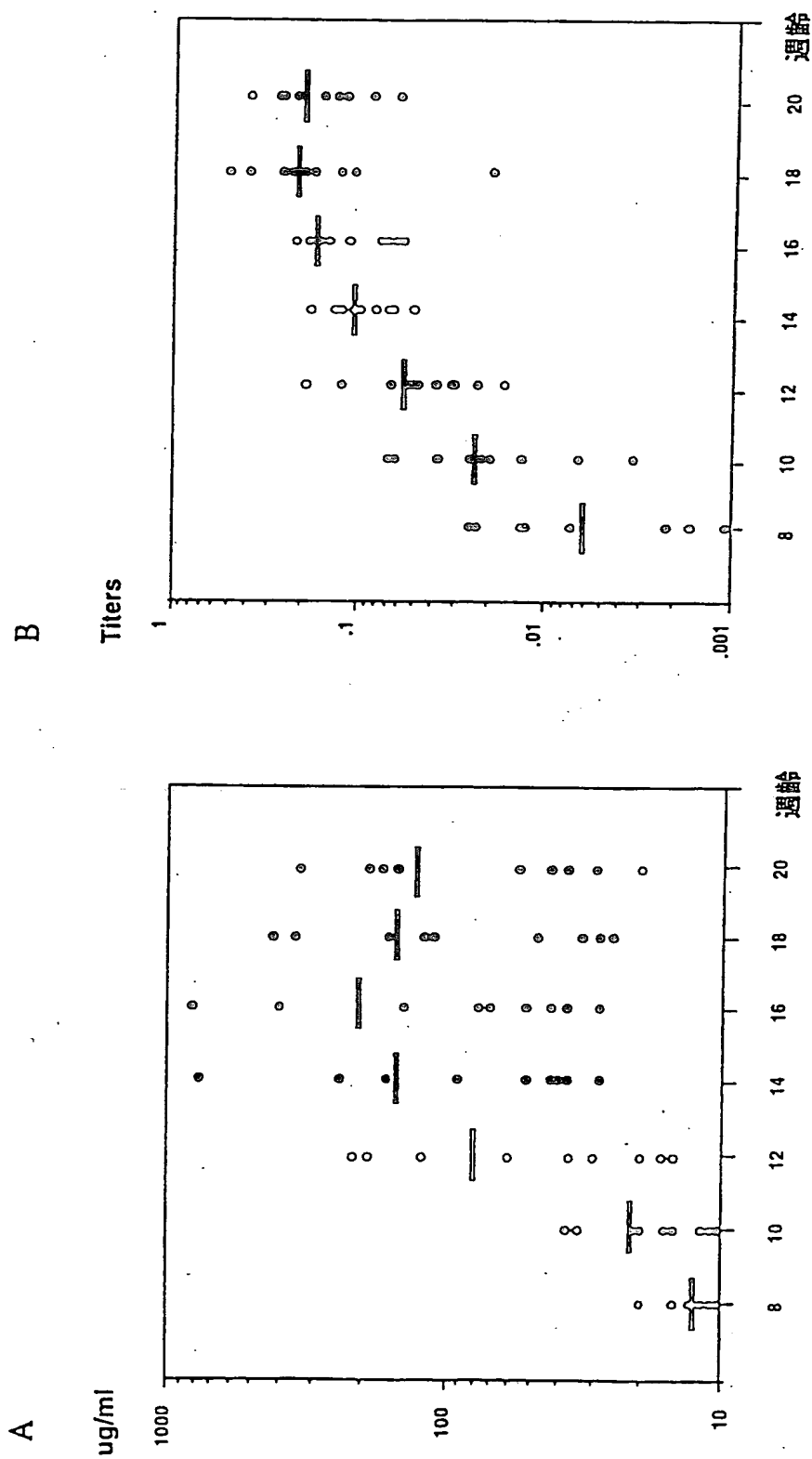
7/10

図 7



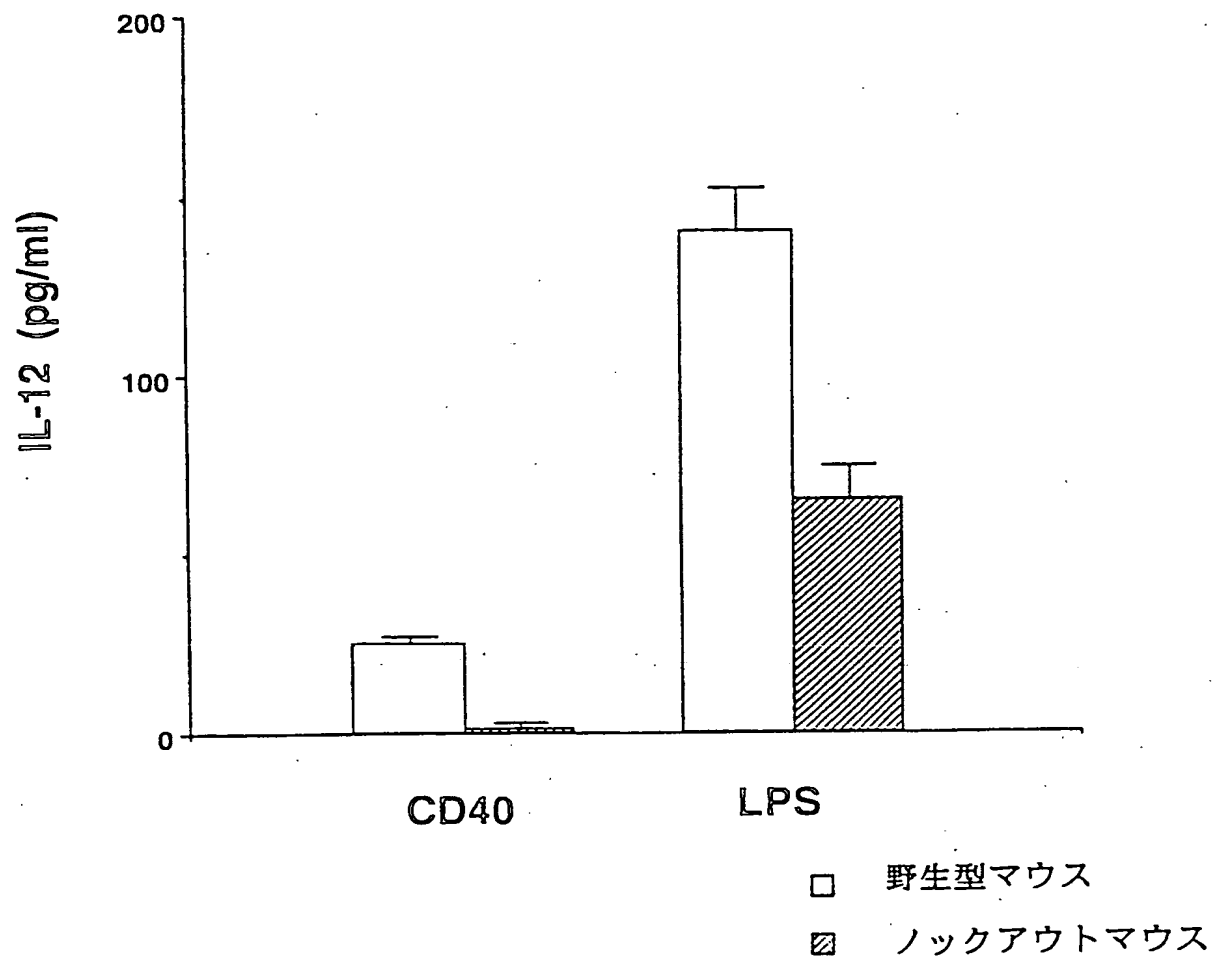
8/10

図 8



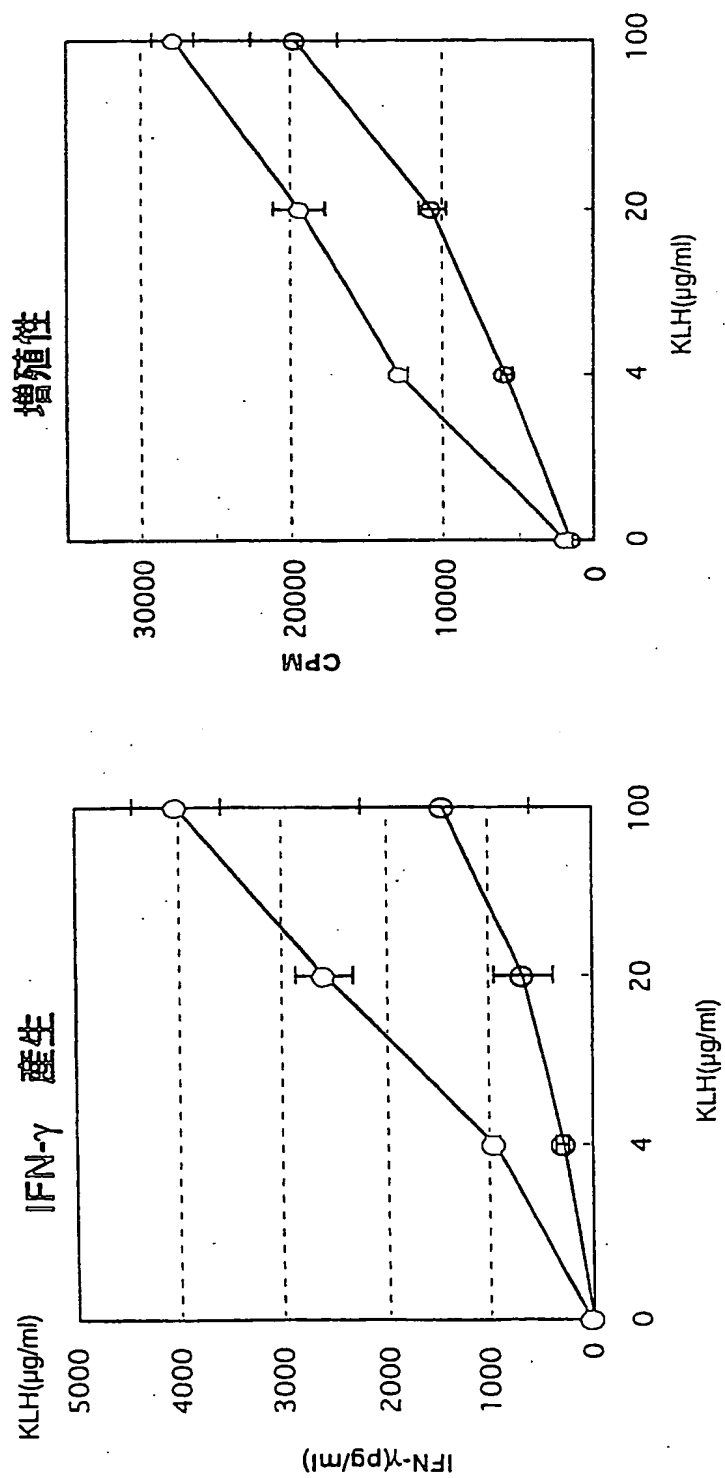
9/10

図 9



10/10

図 10



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Screening Method Using CD100

5 <130> 2611WOOP

<150> JP 11-157111

<151> 1999-06-03

<160> 10

<210> 1

10 <211> 861

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Arg Met Cys Ala Pro Val Arg Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Val

15 1 5 10 15

Val Leu Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Val Pro Arg Leu Thr Trp

20 25 30

Glu His Gly Glu Val Gly Leu Val Gln Phe His Lys Pro Gly Ile Phe

35 40 45

20 Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Met Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Val

50 55 60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu

65 70 75 80

Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ser Lys

25 85 90 95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile

100 105 110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ser Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr

115 120 125

Asn Ala Phe Gln Pro Thr Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
 130 135 140
 Phe Leu Gly Lys Ser Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
 145 150 155 160
 5 Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Gly Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
 180 185 190
 Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
 10 195 200 205
 Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro
 210 215 220
 Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
 225 230 235 240
 15 Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val
 245 250 255
 Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
 260 265 270
 Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Lys Pro Asp Ser Gly Leu
 20 275 280 285
 Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu
 290 295 300
 Lys Glu Pro Val Phe Tyr Ala Val Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
 305 310 315 320
 25 Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val
 325 330 335
 Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350
 Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly

	355	360	365
	Ala Cys Ile Asp Ser Glu	Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu	
	370	375	380
	Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met		
5	385	390	395 400
	Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys		
	405	410	415
	Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp		
	420	425	430
10	Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu		
	435	440	445
	His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr		
	450	455	460
	Gln Leu Phe Arg Asp Phe Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Ser Ser		
15	465	470	475 480
	Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val		
	485	490	495
	Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys		
	500	505	510
20	Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala		
	515	520	525
	Cys Val Thr Leu His Gln Glu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln		
	530	535	540
	Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser		
25	545	550	555 560
	Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys		
	565	570	575
	Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly		
	580	585	590

Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His
 595 600 605
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
 610 615 620
 5 Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro
 645 650 655
 Thr Ser Glu Asp Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met
 10 660 665 670
 Pro Val Gly Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp
 675 680 685
 Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly
 690 695 700
 15 Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His
 705 710 715 720
 Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met
 725 730 735
 Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr
 20 740 745 750
 Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Cys Leu Lys Phe Arg Ser
 755 760 765
 Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu
 770 775 780
 25 Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln
 785 790 795 800
 Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr
 805 810 815
 Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

	820	825	830
	Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys		
	835	840	845
	Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp		
5	850	855	860
	<210> 2		
	<211> 2769		
	<212> DNA		
	<213> Mouse		
10	<400> 2		
	gaattcggca cgaggccatc catgtgtgcc cgttgcctgaa ggcctcgggtg gcccctgccc	60	
	atgaggatgt gtgccccgt tagggggctg ttcttggccc tggtagtagt gttagaacc	120	
	gcggtggcat ttgcacctgt gccctggctc acctgggaac atggagaggt aggtctgggtg	180	
	cagtttcaca agccaggcat ctttaactac tggcccttgc tgatgagtga ggacaaagac	240	
15	actctgtatg taggcgccc ggaagcagtc ttgcagtga atgcgctgaa catctctgag	300	
	aagcaaatg aggtatatg gaaggtctct gaagacaaaa aatccaagtg tgcagagaag	360	
	gggaaatcaa agcagacgga atgcctaaac tacattcgag tactacagcc actaagcagc	420	
	acttccctct atgtgtgtgg gaccaatgcg ttccagccca cctgtgacca cctgaacttg	480	
	acatcttca agtttctggg gaaaagtga gatggcaaag gaagatgcc cttcgacccc	540	
20	gcccacagct acacatcagt catggttggg ggcgagctct actctgggac gtcttataat	600	
	ttcttgggca gtgaacccat catctctcga aactcttccc acagtcctt gaggacggag	660	
	tatgccatcc cgtggctgaa cgagcctagc ttctctttg ctgacgtgat ccagaaaagc	720	
	ccagatggtc cggaggggtga agatgacaag gtctacttct tttttacgga ggtatccgtg	780	
	gagtacgaat tctcttcaa gttagatgac ccgcgagttg ccagggtgtg caagggcgac	840	
25	cagggcggcc tgcggacttt gcaaaaaaag tggacctct tcttaaaggc caggctgac	900	
	tgctccaagc cagacagtgg cctggcttcc aacatacttc aggatgtgtt tgtgtgagg	960	
	gccccgggccc tcaaggagcc tgtgttctat gcggtcttca ccccacagct gaacaatgtg	1020	
	ggtctgtcag cgggtgtcgc ctacacactg gccacgggtg aggcagctct cttccgtgga	1080	
	aagtacatgc agagtgccac agtggagcag tctcacacca agtgggtgcg ctacaatggc	1140	



ccagtgccca cccccgacc tggagcgtgt atcgacagtg aggcccgggc agccaactac 1200
 accagctcct tgaatctccc agacaaaaca ctgcagtttg taaaagacca ccctttgatg 1260
 gatgactcag tgaccccgat agacaacaga cccaagctga tcaaaaaaga tgtaaactac 1320
 acccagatag tggtagacag gacccaggcc ctggatggga ctctctacga cgtcatgttc 1380
 5 atcagcacag accggggagc tctgcataaa gcagtcatcc tcacaaaaga ggtgcatgtc 1440
 atcgaggaga cccaactctt cggggactct gaaccggctc taactctgct gctatcgtca 1500
 aagaagggga ggaagtittg ctatgcaggc tccaactctg gagtgggtcca agcgccccctg 1560
 gcattctgcg aaaagcacgg tagctgtgaa gactgtgtgt tagcacggga cccctactgt 1620
 gcctggagcc cagccatcaa ggcttggtt accctgcacc aggaagaggc ctccagcagg 1680
 10 ggctggattc aggacatgag cggtagacaca tctcatgcc tggataagag taaagaaagt 1740
 ttcaaccagc attttttcaa gcacggcggc acagcggaac tcaaatgttt caaaagtcc 1800
 aacctagccc gggtagtatg gaagttccag aatggcgagt tgaaggccgc aagtcccaag 1860
 tacggctttg tgggcaggaa gcacctgtc atcttcaacc tgtcggacgg agacagcggc 1920
 gtgtaccagt gcctgtcaga ggaaaggggt aggaataaaa cggctctcca gctgtctggcc 1980
 15 aagcacgttc tggaagtga gatgttacct cggaccccc cctcacctac ctacagaggat 2040
 gttcagacag aaggtagtaa gatcacatcc aaaatgccgg ttggatctac ccaggggtcc 2100
 tctccccct ccccggtct gtgggcaacc tccccagag ccgccacct acctcccaag 2160
 tctctctcg gcacatctg tgaaccaaag atggatcat acacgggtcc ccagctccac 2220
 tcagagaaga cgggtgtat caagttccagt gacaaccgcc tgcatagtc tctctctctc 2280
 20 ttcatctttg tctcttctt ctgcctcttt tctacaact gctacaaggg ctacctgccc 2340
 ggacagtgt taaaattccg ctacgcccct ctgcttggaa agaaaacacc caagtcagac 2400
 ttctctgacc tggagcagag tgtgaaggag acactggctg agcctgggag ctctctccag 2460
 cagaacggcg accaccccaa gccagcccct gatacgggct atgaaacgga gcaggacacc 2520
 atcaccagca aagteccac ggatcgtgag gactcgcaac ggatcgatga actctctgcc 2580
 25 cgggacaaac cgtttgatgt caagtgtgaa ctgaagtgt cagattcgga tcttgacggg 2640
 gactgaggcc agcgtgtccc agcccatgcc cctctgtctt cgtggagagt gtgtgttga 2700
 gccattcag tagccgagtc ttgtcactct gtgccagcct cagtcctgtg tccccctttt 2760
 ctctggttt 2769

7/19

<211> 862

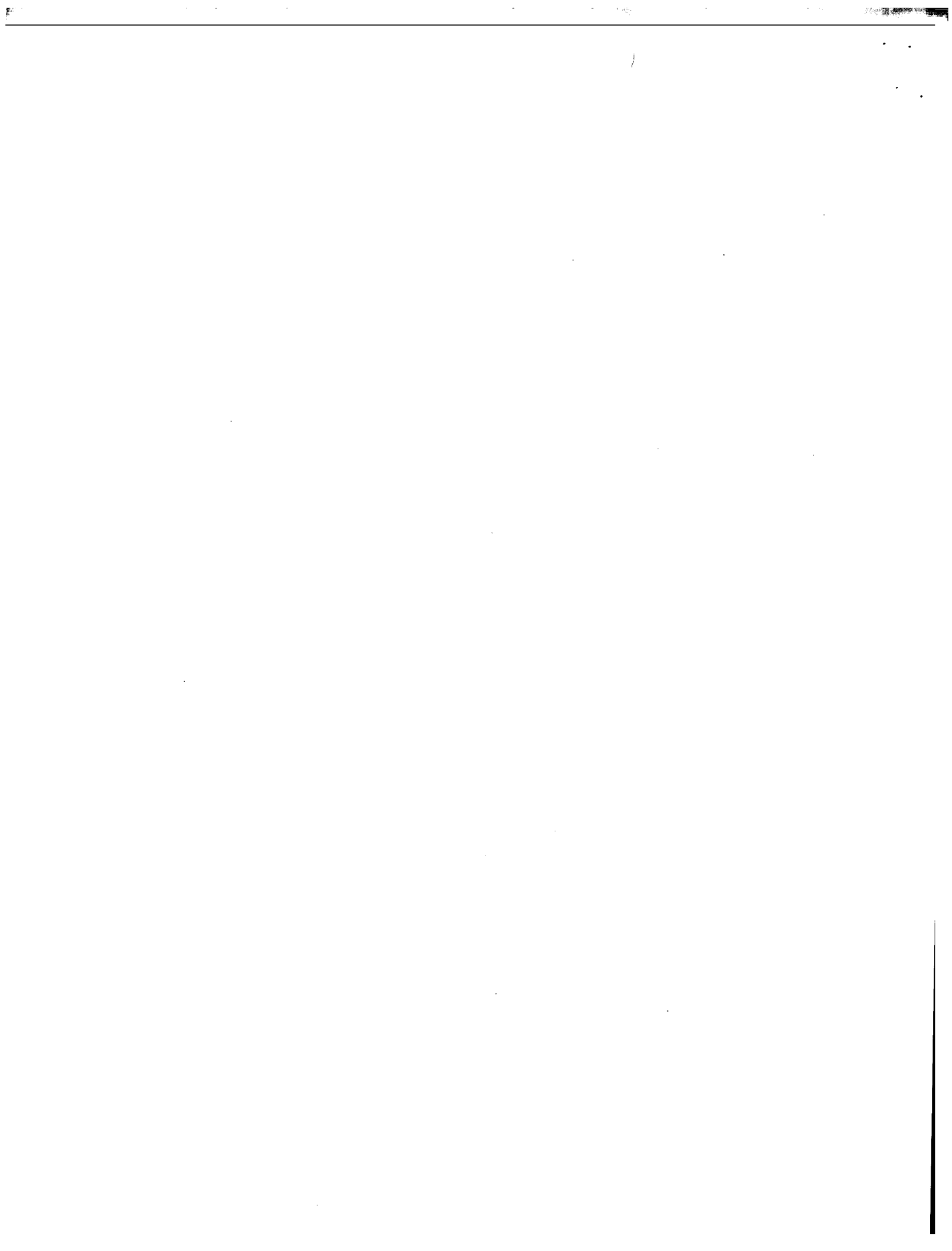
<212> PRT

<213> Human

<400> 3

5 Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
 20 25 30
 Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
 10 35 40 45
 Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
 50 55 60
 Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
 65 70 75 80
 15 Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys
 85 90 95
 Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
 100 105 110
 Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
 20 115 120 125
 Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
 130 135 140
 Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
 145 150 155 160
 25 Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
 180 185 190
 Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu

	195	200	205
	Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro		
	210	215	220
	Asp Gly Glu Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val		
5	225	230	235 240
	Glu Tyr Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val		
	245	250	255
	Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr		
	260	265	270
10	Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu		
	275	280	285
	Val Phe Asn Val Leu Arg Asp Val Phe Val Leu Arg Ser Pro Gly Leu		
	290	295	300
	Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val		
15	305	310	315 320
	Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val		
	325	330	335
	Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His		
	340	345	350
20	Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly		
	355	360	365
	Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu		
	370	375	380
	Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met		
25	385	390	395 400
	Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys		
	405	410	415
	Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp		
	420	425	430



9/19

Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
 435 440 445
 His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
 450 455 460
 5 Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
 485 490 495
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys
 10 500 505 510
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr
 515 520 525
 Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln
 530 535 540
 15 Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser
 545 550 555 560
 Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
 565 570 575
 Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly
 20 580 585 590
 Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn
 595 600 605
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
 610 615 620
 25 Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala
 625 630 635 640
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro
 645 650 655
 Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val

10/19

	660	665	670
	Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln		
	675	680	685
	Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr		
5	690	695	700
	Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu		
	705	710	715 720
	His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu		
	725	730	735
10	Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe		
	740	745	750
	Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg		
	755	760	765
	Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp		
15	770	775	780
	Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser		
	785	790	795 800
	Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu		
	805	810	815
20	Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp		
	820	825	830
	Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val		
	835	840	845
	Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp		
25	850	855	860

<210> 4

<211> 4157

<212> DNA

<213> Human



<400> 4

ctgagccgca tctgcaatag cacactigcc cggccaccig ctgccgtigag cctttgctgc 60
 tgaagcccci ggggtcgcc taccatgatg aggatgtgca ccccatlag ggggtgctc 120
 atggcccttg cagtgaigt tgggacagcg atggcatttg caccataacc ccggaicacc 180
 5 tgggagcaca gagaggigca cctgggtgcag ttctatgagc cagacatcta caactactca 240
 gccttgctgc tgagcgagga caaggacacc ttgtacatag gtgcccggga ggcggcttc 300
 gctgtgaacg cactcaacat ctccgagaag cagcatgagg tgtattgga ggtctcagaa 360
 gacaaaaaag caaatgtgc agaaaagggg aaatcaaac agacagagtg cctcaactac 420
 atccgggtgc tgcagccact cagcgccact tccctttacg tgtgtgggac caacgcattc 480
 10 cagccggcct gtgaccacct gaacttaaca tcttttaagt ttctggggaa aaatgaagat 540
 ggcaaaggaa gatgtccct tgcaccagca cacagctaca catccgtcat ggttgatgga 600
 gaactttatt cggggacgtc gtataatttt ttgggaagtg aaccatcat ctcccgaaat 660
 tcttcccaca gtctctgag gacagaatat gcaatccctt ggctgaacga gcctagtctc 720
 gtgtttgctg acgtgatccg aaaaagccca gacagccccg acggcgagga tgacagggtc 780
 15 tactttctct tcacggaggt gtctgtggag tatgagttg tgttcagggt gctgatccca 840
 cggatagcaa gagtgtgcaa gggggaccag ggcggcctga ggacctgca gaagaaatgg 900
 acctccttcc tgaagccccg actcatctgc tcccgccag acagcggctt ggtcttcaat 960
 gtgctgcggg atgtcttctg gctcaggctc ccgggcctga aggtgcctgt gtctctatgca 1020
 ctcttcaccc cacagctgaa caacgtgggg ctgtcggcag tgtgcgcta caacctgtcc 1080
 20 acagccgagg aggtcttctc ccacgggaag tacatgcaga gcaccacagt ggagcagctc 1140
 cacaccaagt ggggtgccta taatggcccg gtaccaagc cgcgccctgg agcgtgcatc 1200
 gacagcgagg cacgggccgc caactacacc agctccctga atttgccaga caagacgtg 1260
 cagttcgtta aagaccacc ttgatggat gactcggtaa cccaataga caacaggccc 1320
 aggttaatca agaaagatgt gaactacacc cagatcgtgg tggaccggac ccaggccctg 1380
 25 gatgggactg tctatgatgt catgtttgtc agcacagacc ggggagctct gcacaaagcc 1440
 atcagcctcg agcacgtgt tcatatcatc gaggagaccc agctcttcca ggactttgag 1500
 ccagtccaga cctgtctgt gtcttcaaag aagggaaca ggtttgtcta tgctggctct 1560
 aactcgggcg tggtcaggc cccgtggcc ttctgtggga agcacggcac ctgcgaggac 1620
 tgtgtgtggt cgcgggaccc ctactgcgc tggagccccg ccacagcgac ctgcgtggct 1680

ctgcaccaga ccgagagccc cagcaggggt ttgattcagg agatgagcgg cgatgcttct 1740
giglgcccgg ataaaagtaa aggaagttac cggcagcatt ttttcaagca cggltggcaca 1800
gcggaactga aatgctccca aaaatccaac ctggcccggg tcttllggaa gticcagaat 1860
ggcgtgtlga aggccgagag cccaagtac ggctttatgg gcagaaaaaa ctgtctcatc 1920
5 ticaactlgt cagaaggaga cagtggggtg taccagtgcc tgtcagagga gagggttaag 1980
aacaaaacgg tcttccaagt ggtcgccaag cacgtccctg aagtgaaggt ggltccaaag 2040
cccgtagtgg cccccacctt gtcagtltgt cagacagaag gtagtaggat tggcaccaaa 2100
gtgtltgggtg catccacca agggcttctt cccccaaccc cagccgtgca ggccacctcc 2160
tccggggcca tcaccttcc tccaagcct gcgcccaccg gcacatctg cgaaccaaag 2220
10 atcgtaica acacggctcc ccagctccac tcggagaaaa ccatgtatct taagtccagc 2280
gacaaccgcc tcttcaigt cctcttctc tcttctttg tctcttctt ctgctcttt 2340
ttctacaact gctataaggg atacctgccc agacagtgtc tgaaattccg ctcgggcccta 2400
ctaattggga agaagaagcc caagtcagat ttctgtgacc gtgagcagag cctgaaggag 2460
acgttagtag agccaggag ctctctccag cagaatgggg agcaccccaa gccagccctg 2520
15 gacaccggct atgagaccga gcaagacacc atcaccagca aagtcceccac ggatagggag 2580
gactcacaga ggatcgacga ctttctgtcc agggacaagc ctttgacgt caagtgtgag 2640
ctgaagttcg ctgactcaga cgcagatgga gactgaggcc ggctgtgcat ccccgctggt 2700
gcctcggtcg cgacgtgtc aggcgtggag agttltgtt tcttctgtt cagtatccga 2760
gtctcggtga gtgtgcgtg ggttagcccg catcgtgcag acaacctcag tctctltgtc 2820
20 tattttctt tgggttagag ctgtgacttg gtttctctt gtcccttttg aaaaatgaca 2880
agcatlgtat ccagctctg tgttcgaag tcagtcggag tacttgaaga agggccacgg 2940
gcggcacgga gtccctgagc ctttctgtg gtgggggaaa ggtggctgga cctctgtltg 3000
ctgagaagag catcccttca gcttccctc cccgtagcag ccactaaaag attatttaat 3060
tccagattgg aaatgacatt ttagtttatt agattggtaa ctatcgctt gtgtccaga 3120
25 ttggcacgaa ctttcttct cacttaatta ttttttagg atttltgtt gattgtgtt 3180
atgtcatggg tcatllllt ttagttacag aagcagttgt gttaatatt agaagaagat 3240
gtatatcttc cagattltg tatatatlt gcataaaata cggcttacgt tgcctaagat 3300
tctcagggat aaacttctt ttgctaaatg catcttctt gcttttagaa atgtagacat 3360
aaacactccc cggagcccac tcacctttt tcttttctt tttttttt taactttatt 3420



ccttgaggga agcattgttt ttggagagat ttctttctg tacttcgttt tacttttctt 3480
 tttttttaac ttttactctc tcgaagaaga ggaccttccc acatccacga ggtgggtttt 3540
 gagcaaggga aggtagcctg gatgagctga gtggagccag gctggcccag agctgagatg 3600
 ggagtgcggt acaatctgga gcccacagct gtcggtcaga acctcctgtg agacagatgg 3660
 5 aaccttcaca agggcgccct ttgttctctg aacatctcct ttctcttctt gcttcaattg 3720
 ctaccactt gcctgcccag actttctatc cagcctcact gagctgcca ctactggaag 3780
 ggaactgggc ctcggtggcc ggggccgcga gctgtgacca cagcacctc aagcatacgg 3840
 cgctgttctt gccactgtcc tgaagatgtg aatgggtggt acgatttcaa cactggttaa 3900
 ttacacactc catctccccg ctttgtaa atccatcggg aagagacttt ttttccatgg 3960
 10 tgaagagcaa laaactctgg atgtttgtgc gcgtgtgtgg acagtcttat ctccagcat 4020
 gataggattt gaccattttg gtgtaaacat ttgtgtttta taagatttac ctgtttttta 4080
 ttttctact ttgaattgta tacatttga aagtaaccaa ataaatgaga agcttctatc 4140
 cttaaaaaaa aaaaaaa 4157

<210> 5

15 <211> 361

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 5

20	Met	Ala	Asp	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Arg	Phe	Val	Lys	Val	Pro
					5					10					15	
	Leu	Lys	Asn	Ser	Ala	Ser	Asn	His	Leu	Gly	Gln	Asp	Cys	Glu	Ala	Tyr
					20					25					30	
	Glu	Asp	Gly	Glu	Leu	Thr	Tyr	Glu	Asn	Val	Gln	Val	Ser	Pro	Val	Pro
					35					40					45	
25	Gly	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Ala	Asp	Lys	Ala	Gly
					50					55					60	
	Val	Gly	Ser	Glu	Gln	Pro	Thr	Ala	Thr	Trp	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Ser
					65					70					75	
	Ala	Leu	Arg	Gln	Ile	Pro	Arg	Cys	Pro	Thr	Val	Cys	Leu	Gln	Tyr	Phe

14/19

	85	90	95
	Leu Leu Gly Leu Leu Val Ser Cys Leu Met Leu Gly Val Ala Val Ile		
	100	105	110
	Cys Leu Gly Val Arg Tyr Leu Gln Val Ser Arg Gln Phe Gln Glu Gly		
5	115	120	125
	Thr Arg Ile Trp Glu Ala Thr Asn Ser Ser Leu Gln Gln Gln Leu Arg		
	130	135	140
	Glu Lys Ile Ser Gln Leu Gly Gln Lys Glu Val Glu Leu Gln Lys Ala		
	145	150	155
10	Arg Lys Glu Leu Ile Ser Ser Gln Asp Thr Leu Gln Glu Lys Gln Arg		
	165	170	175
	Thr His Glu Asp Ala Glu Gln Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Glu Arg		
	180	185	190
	Ala Lys Thr Lys Glu Asn Leu Lys Thr Glu Glu Glu Arg Arg Arg Asp		
15	195	200	205
	Leu Asp Gln Arg Leu Thr Ser Thr Arg Glu Thr Leu Arg Arg Phe Phe		
	210	215	220
	Ser Asp Ser Ser Asp Thr Cys Cys Pro Cys Gly Trp Ile Pro Tyr Gln		
	225	230	235
20	Glu Arg Cys Phe Tyr Ile Ser His Thr Leu Gly Ser Leu Glu Glu Ser		
	245	250	255
	Gln Lys Tyr Cys Thr Ser Leu Ser Ser Lys Leu Ala Ala Phe Asp Glu		
	260	265	270
	Pro Ser Lys Tyr Tyr Tyr Glu Tyr Leu Ser Asp Ala Pro Gln Val Ser		
25	275	280	285
	Leu Pro Ser Gly Leu Glu Glu Leu Leu Asp Arg Ser Lys Ser Tyr Trp		
	290	295	300
	Ile Gln Met Ser Lys Lys Trp Arg Gln Asp Ser Asp Ser Gln Ser Arg		
	305	310	315
			320



15/19

His Cys Val Arg Ile Lys Thr Tyr Tyr Gln Lys Trp Glu Arg Thr Ile

325

330

335

Ser Lys Cys Ala Glu Leu His Pro Cys Ile Cys Glu Ser Glu Ala Phe

340

345

350

5 Arg Phe Pro Asp Gly Ile Asn Leu Asn

355

360

<210> 6

<211> 1357

<212> DNA

10 <213> Mouse

<400> 6

tggaagactg tgaagcagag gcgcccaggg ctatggctga cgctatcacg tatgcagacc 60

tgcgccttgt gaaagtgtccc ctgaagaaca gcgcattctaa ccatctagga caggactgtg 120

aggcctatga agatggggaa ctacactacg agaatgtgca agtgtctcca gtcccaggag 180

15 ggccaccagg ctgggtcttc cctgcactag cggacaaagc aggggtcggg tcagagcaac 240

caactgagac ctggagctct gigaactcgt ctgctctcag gcagattccc cgctgtccta 300

cagctgtctt gcaatacttc ttgcttggcc ttctcgtgtc ctgtctgatg ttaggggtgg 360

ctgtcatctg cctgggagtt cgctatctgc aggtgtctcg gcagttccag gaggggacca 420

ggatttggga agccaccaat agcagcctgc agcagcagct cagggagaag ataagtcagc 480

20 tggggcagaa ggaggtggag cttcagaagg ctcgaaaga gctgatctcg agccaggaca 540

cattacagga gaagcagagg actcacgagg acgtgagca gcaactacaa gcctgccagg 600

ctgagagagc gaagaccaag gagaacctga aaactgagga ggagcggagg agggacctgg 660

accagaggtt gacaagcacg cgggagacac tgaggcgctt ctctctgat tcatcagaca 720

cctgctgtcc atgcggatgg attccatctc aggaaagggt ctittacatc tcacataccc 780

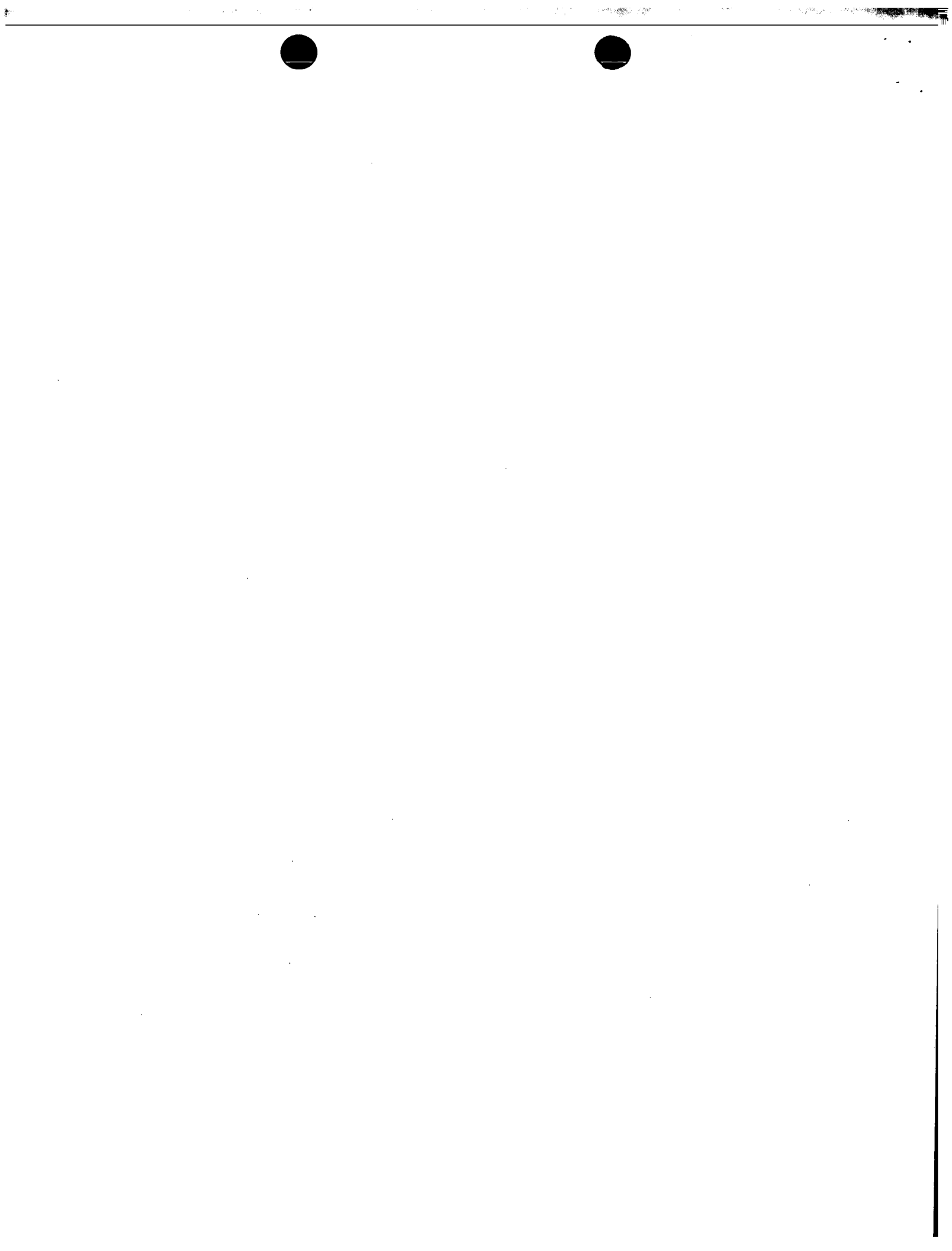
25 tcggaagtct ggaggagagc caaaaatact gcacatctct gtcttccaaa ctggcagcat 840

tcgatgaacc ttctaagtat tactatgaag ttctctgtcc cagcggctta gaggagtgtc 900

tagatcgttc gaagtcatat tggatacaga tgagcaagaa gtggaggcag gactctgact 960

ctcaaagccg acattgtgtc aggataaaaa catattacca gaagtgggaa agaacaattt 1020

ccaagltgtc agagcttcac ccctgcatit gtgagtcgga ggctttcagg ttctctgatg 1080



ggatcaatct gaactgaaac ggacacttga acaagacctt glgacctaca tccctaacct 1140
 acggcctgcc aatttttaag actgctattc ctccagcact ccttcactct cgggcatgcc 1200
 cagctaaggg atgacctgct gcttgcttga aagctgctcc agaaactgga cttctcttgg 1260
 gaagagtaaa gaagcctcca gaaaagacctt gaccttccctt aagaacttcc caaactagag 1340
 5 atgggtcagg ggagggc 1357

<210> 7

<211> 359

<212> PRT

<213> Human

10 <400> 7

Met Ala Glu Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Arg Phe Val Lys Ala Pro

5

10

15

Leu Lys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Leu Gly Gln Asp Pro Gly Ala Asp

20

25

30

15 Asp Asp Gly Glu Ile Thr Tyr Glu Asn Val Gln Val Pro Ala Val Leu

35

40

45

Gly Val Pro Ser Ser Leu Ala Ser Ser Val Leu Gly Asp Lys Ala Ala

50

55

60

Val Lys Ser Glu Gln Pro Thr Ala Ser Trp Arg Ala Val Thr Ser Pro

20

65

70

75

80

Ala Val Gly Arg Ile Leu Pro Cys Arg Thr Thr Cys Leu Arg Tyr Leu

85

90

95

Leu Leu Gly Leu Leu Leu Thr Cys Leu Leu Leu Gly Val Thr Ala Ile

100

105

110

25 Cys Leu Gly Val Arg Tyr Leu Gln Val Ser Gln Gln Leu Gln Gln Thr

115

120

125

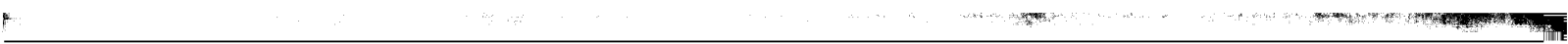
Asn Arg Val Leu Glu Val Thr Asn Ser Ser Leu Arg Gln Gln Leu Arg

130

135

140

Leu Lys Ile Thr Gln Leu Gly Gln Ser Ala Glu Asp Leu Gln Gly Ser



17/19

	145		150		155		160										
	Arg	Arg	Glu	Leu	Ala	Gln	Ser	Gln	Glu	Ala	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Arg	
			165				170						175				
	Ala	His	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys	Gln	Ala	Asp	Arg	
5			180				185						190				
	Gln	Lys	Thr	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Arg	Arg	Ala	
			195				200						205				
	Leu	Glu	Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Met	Glu	Asn	Arg	Leu	Lys	Pro	Phe	Phe	
			210				215						220				
10	Thr	Cys	Gly	Ser	Ala	Asp	Thr	Cys	Cys	Pro	Ser	Gly	Trp	Ile	Met	His	
	225					230					235				240		
	Gln	Lys	Ser	Cys	Phe	Tyr	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Lys	Asn	Trp	Gln	Glu	
					245						250				255		
	Ser	Gln	Lys	Gln	Cys	Glu	Thr	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Thr	Phe	Ser	
15			260						265					270			
	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gln	Ser	His	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Asn	Ser	Leu	Leu	
			275						280					285			
	Pro	Asn	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly	Leu	Ser	Ser	Asn	
			290					295					300				
20	Lys	Asp	Trp	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Thr	Gln	Arg	Thr	Arg	Thr	Tyr	Ala	
	305					310					315				320		
	Gln	Ser	Ser	Lys	Cys	Asn	Lys	Val	His	Lys	Thr	Trp	Ser	Trp	Trp	Thr	
					325						330				335		
	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Leu	Pro	Tyr	Ile	Cys	Glu	Met	
25			340						345					350			
	Thr	Ala	Phe	Arg	Phe	Pro	Asp										
			355			359											

<210> 8

<211> 1531



<212> DNA

<213> Human

<400> 8

```

5  agtcacagag ggaacacaga gcctagttgt aaacggacag agacgagagg ggcaagggag 60
   gacagtggat gacaggggaag acgagtgagg gcagagctgc tcaggaccat ggctgaggcc 120
   atcacctatg cagatctgag gtltgtgaag gctcccciga agaagagcat ciccagccgg 180
   ttaggacagg acccaggggc tgaatgatgat ggggaaatca cctacgagaa tgttcaagtg 240
   cccgcagtcg taggggtgcc ctcaagcttg gcttcttctg tactagggga caaagcagcg 300
   gtcaagtcgg agcagccaac tgcgtccctg agagccgtga cgtcaccagc tgtcgggcgg 360
10 atttccccct gccgcacaac ctgctgcga tacttcttgc tcggcctgct cctcacctgc 420
   ctgctgttag gagtgaccgc catctgccig ggagtgcgt atctgcaggt gctcagcag 480
   ctccagcaga cgaacagggt tctggaagtc actaacagca gccagaggca gcagctccgc 540
   ctcaagataa cgcagctggg acagagtga gaggatctgc aggggtccag gagagagctg 600
   gcgcagagtc aggaagcact acaggtggaa cagagggctc atcaggcggc cgaagggcag 660
15 ctacaggcct gccaggcaga cagacagaag acgaaggaga ccttgcaaag tgaggagcaa 720
   cagaggaggg ccttggagca gaagctgagc aacatggaga acagactgaa gcccttcttc 780
   acatgcggct cagcagacac ctgctgtccg tcgggatgga taatgcatca gaaaagctgc 840
   ttttacatct cacttacttc aaaaaattgg caggagagcc aaaaacaatg tgaaactctg 900
   tcttccaagc tggccacatt cagtgaatt tatccacaat cacactctta ctactctta 960
20 aattcactgt tgccaaatgg tggttcaggg aattcatatt ggactggcct cagctctaac 1020
   aaggattgga agttgactga tgatacaca cgcactagga ctatgtctca aagctcaaaa 1080
   tgtaacaagg tacataaaac ttggtcatgg tggacactgg agtcagagtc atgtagaagt 1140
   tctcttccct acatctgtga gatgacagct ttcaggtttc cagattagga cagtcctttg 1200
   cactgagttg acactcatgc caacaagaac ctgtgcccc tcttcttaac ctgaggcctg 1260
25 gggttcttca gaccatctcc ttcatcttgg gcagtgccag ccaccggctg acccacacct 1320
   gacacttcca gccagtctgc tgcctgtctc ctcttctga aactggactg ttcctgggaa 1380
   aagggatgaag ccacctctag aagggacttt ggcttcccc caagaacttc ccatggtaga 1440
   atggggatgg ggaggagggc gcacgggtg agcggatagg ggcggtcccg agccagccag 1500
   gcagttttat tgaatcttt ttaaataatt g 1531

```



<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223>

<400> 9

gcgtgcgact gtgtgcccggt tgctgaaggc ct

32

<210> 10

10 <211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

15 <400> 10

gacggatcct acttactttg ctttgcttgc ttgagataca ccgtcttctc tga

53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P27/04, A61P37/06, C12N15/12, C12Q 1/02, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P27/04, A61P37/06, C12N15/12, C12Q 1/02, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1995 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATHARYN T. HALL et al., "human CD100 a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, pp.11780-11785(1996)	1-16
A	WILLIAM H. ROBINSON et al., "EXTENSIVE POLYMORPHISM IN THE EXTRA CELLULAR DOMAIN OF THE MOUSE B CELL DIFFERENTIATION ANTIGEN Lyb-2 CD72", <i>The Journal of Immunology</i> , Vol.149, pp.880-886	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 September, 2000 (19.09.00)

Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P27/04, A61P37/06, C12N15/12, C12Q 1/02, A01K67/027		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P27/04, A61P37/06, C12N15/12, C12Q 1/02, A01K67/027		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1995年 日本国公開実用新案公報 1971-2000年 日本国登録実用新案公報 1994-2000年 日本国実用新案登録公報 1996-2000年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICST, BIOSIS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KATHARYN T. HALL et al "human CD100 a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 11780-11785 (1996)	1-16
A	WILLIAM H. ROBINSON et al "EXTENSIVE POLYMORPHISM IN THE EXTRA CELLULAR DOMAIN OF THE MOUSE B CELL DIFFERENTIATION ANTIGEN Lyb-2 CD72" The Journal of Immunology, Vol. 149, p880-886	1-16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19.09.00	国際調査報告の発送日 24.10.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

